

André Wüst Zibetti

**DESENVOLVIMENTO DE UM
PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS DE
*Rosmarinus officinalis***

Florianópolis
2012

André Wüst Zibetti

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO
DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE *Rosmarinus officinalis***

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química - Departa-
mento de Engenharia Química
e Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito à ob-
tenção do grau de Doutor em
Engenharia Química.

Orientador: Ariovaldo Bolzan
Coorientador: Danielle Barth

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Florianópolis
2012

Zibetti, André Wüst

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE SEPARAÇÃO
DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Rosmarinus officinalis* [tese] / An-
dré Wüst Zibetti; Orientador: Ariovaldo Bolzan – Florianópolis, 2012.
264 p. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2012.

1. Engenharia Química. 2. Separação de compostos bioativos. 3.
Ácido rosmarínico. I. Ariovaldo Bolzan. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. III. Faculdade de Engenharia Química e Alimentos.
IV. Título

André Wüst Zibetti

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO
DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE *Rosmarinus officinalis***

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química - Departa-
mento de Engenharia Química
e Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito à ob-
tenção do grau de Doutor em
Engenharia Química.

Trabalho aprovado. Florianópolis, 02 de outubro de 2012:

Ariovaldo Bolzan
Orientador

Professor
Convidado 1

Florianópolis
2012

Aos meus pais, que tornaram tudo isso possível...

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Solange e Geraldo, meus irmãos Marcus, Marcelo e Fabíola pelo amor, apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos de minha vida.

À minha amada Amanda, pelo amor, compreensão, carinho e apoio sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan, pela amizade, incentivo, apoio, contribuição e toda a confiança em mim depositada.

Aos colegas e amigos, Rafael Dias, Carlos Claumann (Caio), Mayra Arauco, Patricia Oliveira, Jonathan, Iaçanã, Joel, Ronny, Alessandra, Tiago, Júlio, André e Letícia pelo conhecimento compartilhado e pelos bons momentos passados no laboratório.

Aos colegas de pós-graduação e do LCP como um todo, pelo bom ambiente de trabalho proporcionado, em especial a Ledir e a Monique pela atenção e presteza.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Madame Danièle BARTH, Professeur à l'ENSIC-LSGC de Nancy, pour m'avoir aimablement accueillie au sein de son laboratoire, en me permettant d'y réaliser une partie importante de cette thèse. Merci pour sa collaboration et de son soutien. À mes amis Zhenghuan, Karim, Neila, Camel, Akim, Elodi, Cedric, Roberto, Clément et Haifa, pour l'amitié et la pause-café de m'avoir fait la vie plus intéressante. Merci à tous les collègues et amis du LRGP.

Aos estagiários de iniciação científica Felipe e Márcio.

À CAPES (PDEE:3844-10-2), ao CNPQ e à FINEP pelo apoio financeiro.

Resumo

O presente trabalho tem o objetivo principal de desenvolver um processo para separar compostos bioativos do alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Visando a aplicação desses compostos como conservador de alimentos, utilização em fármacos e outras aplicações, onde podem ser requeridos solventes considerados GRAS (*Generally Reconized as Safe*), durante etapas de sua obtenção. O alecrim é uma erva aromática amplamente estudada e bem conhecida por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Este conjunto de características o torna um potencial ingrediente para aumentar a vida de prateleira de alimentos. Até o momento, poucos estudos foram realizados com a erva cultivada no sudeste do Brasil, pois sua composição química depende de inúmeros fatores, entre eles as características regionais. Dentre os compostos da planta, valem citar os diterpenos fenólicos, como o ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol, que possuem comprovada e potente atividade antioxidante, e os compostos terpênicos como a cânfora, borneol, eucaliptol e verbenona, com propriedades antimicrobianas. O presente projeto faz uma avaliação dessa planta cultivada no Brasil, desde a sua extração até sua aplicação. O trabalho foi distribuído em seis etapas. A primeira compreendeu as avaliações de extração por hidrodestilação e com CO₂ supercrítico, além da caracterização morfológica da planta e da composição química de seus extratos. Nesses ensaios de extração, se observou um maior rendimento quando com o uso de CO₂ supercrítico. Foi possível notar a diferença na composição da planta de origem brasileira com aquelas provenientes de outras regiões de cultivo no mundo. Na etapa seguinte foi avaliado o potencial antimicrobiano *in vitro* e a aplicação dos extratos, como conservador de alimento (presunto cozido embalado a vácuo), onde demonstraram seu potencial na conservação desse produto. Desta forma, o potencial antimicrobiano do extrato da planta frente a microrganismos gram-positivos proporcionou um aumento da vida de prateleira (5-7 dias) do presunto embalado a vácuo quando tratado com extrato de alecrim. Na terceira etapa foi realizada a avaliação da composição da fase vapor (aroma)

do alecrim, como uma técnica que pode ser utilizada como marcador da qualidade da planta. Com a técnica de múltipla extração de *headspace* (MHE) foi possível quantificar os compostos presentes no aroma percebido pelo olfato humano e demonstrar a influência do processo de secagem nessa composição. Além disso, determinaram-se os compostos responsáveis pelo aroma característico do alecrim e seus extratos. Os ensaios de fracionamento (quarta etapa), durante as extrações com CO₂ supercrítico, visando separação dos grupos de compostos bioativos, demonstraram bons resultados, quando se busca extratos com diferentes características na sua composição química. Duas técnicas de fracionamento foram avaliadas, fracionamento durante a extração e durante a separação. O uso do fracionamento, de ambas as técnicas é sugerido como um processo de separação para os grupos de compostos de interesse. Durante essa etapa foram quantificados os compostos majoritários das frações obtidas. Na quinta etapa, foi objetivada a extração e purificação do ácido rosmarínico (AR) oriundo da matriz vegetal. Duas metodologias de extração foram avaliadas, em modo normal e auxiliada por ultrassom 30 °C e 60 °C. Foi desenvolvida uma metodologia de análise (HPLC) utilizando solventes GRAS. A mesma metodologia foi aplicada na purificação do AR, na ampliação de escala desse processo (500x a escala analítica), com um HPLC preparativo. A extração do AR foi avaliada nos resíduos sólidos do alecrim, provenientes da extração supercrítica, onde os resultados demonstram a possibilidade de recuperação desse composto de alto valor agregado. A purificação do AR foi alcançada, estimada com uma pureza de 98 % em relação à área do cromatograma. Na última etapa do trabalho foi realizada uma avaliação econômica dos processos envolvidos na obtenção e purificação dos compostos bioativos do alecrim. Os resultados dessa análise de custo sugerem que os processos envolvidos são economicamente viáveis, no ponto de vista do custo final do produto manufaturado. Foi sugerido o acoplamento dos processos de extração supercrítica, seguida da extração de AR do resíduo vegetal e consequente procedimento de separação e purificação por cromatografia. Ainda, com o reaproveitamento energético utilizando a matriz vegetal esgotada como fonte geradora de energia.

Palavras-chaves: Extração supercrítica, fracionamento, separação cromatográfica, HPLC, atividade antioxidante e antibacteriana, compostos bioativos, ácido rosmarínico.

Abstract

The main goal of the present work is to develop a process that separates bioactive compounds of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Aiming to the application of these compounds as food conservatives, to the use in pharmaceuticals and other applications, in which solvents considered GRAS (Generally Recognized as Safe) may be required during the stages of its attainment. Rosemary is an aromatic herb broadly studied and acknowledged by its antimicrobial and antioxidant properties. This set of features makes it a potential ingredient to increase shelf life of food products. Few studies have been conducted with the herb grown in southeast of Brazil so far because its chemical composition depends on several factors, including regional characteristics. Among the compounds of the plant, it is worth mentioning the phenolic diterpenes, such as rosmarinic acid, carnosic acid and carnosol, which feature proven and strong antioxidant activity, and terpene compounds such as camphor, borneol, eucalyptol and verbenone, with antimicrobial properties. The present project performs an assessment of this plant grown in Brazil, from its extraction to its application. The work was distributed in six stages. The first stage included the assessments of extraction by hydrodistillation and using supercritical CO₂, in addition to the morphologic assessments of the plant and the chemical composition of its extracts. In these extraction trials, a higher output was observed when using supercritical CO₂. It was possible to note the difference in the composition of the plant originally from Brazil comparing to other cultivation regions in the world. On the next stage the antimicrobial potential in vitro and the application of extracts as food conservative (vacuum sealed cooked ham) was assessed, demonstrating the conservation potential of this product. Thus, the antimicrobial potential of the extract of the plant facing gram positive microorganisms promoted an increase in shelf life (5-7 days) of the vacuum sealed ham when treated with rosemary extract. On the third stage an assessment of the composition of the vapor phase (aroma) of rosemary was performed, as a technique that may be used as quality

marker for the plant. With techniques of multiple headspace extraction (MHE) it was possible to quantify the compounds present in the aroma perceived by human olfaction, and to demonstrate the influence of the drying process in this composition. Moreover, the compounds responsible for the feature aroma of rosemary and its extracts were determined. The fractioning trials (fourth stage), during the extractions with supercritical CO₂, aiming to separate the groups of bioactive compounds, showed satisfactory results when seeking for extracts with different characteristics of chemical composition. Two fractioning techniques were evaluated, fractioning during extraction and during separation. The use of fractioning in both techniques is suggested as a separation process of interest compound groups. During this stage the major compounds of the fractions achieved were quantified. The fifth stage aimed to extract and purify the rosmarinic acid (RA) originated from the mother plant. Two methods of extraction were evaluated, in normal mode and aided by ultrasound (30°C e 60°C). An analysis method (HPLC) was developed using GRAS solvents. The same method was applied on the purification of the RA, on the scaling of this process (500x the analytical scale), with a preparative HPLC. The RA extraction was assessed in solid residues of rosemary from the supercritical extraction, where results showed the possibility of recovery of this high added value compound. The purification of the RA was attained, with an estimated purity of 98% concerning the chromatogram area. On the last stage of the work, an economical assessment of the processes involved on the achievement and purification of bioactive compounds of rosemary was performed. The results of this cost analysis suggest that the processes involved are economically viable from the standpoint of the final cost of the product manufactured. It was suggested joining the processes of supercritical extraction, followed by the RA extraction of the plant residue, and subsequent procedure of separation and purification by chromatography. Yet, with the energetic recycling using the depleted raw material plant as generating source of energy.

Key-words: Supercritical extraction, supercritical fractionation, chromatographic separations, HPLC, antimicro-

bial and antioxidant activity, bioactive compounds, rosmarinic acid.

Lista de ilustrações

Figura 1	Diagrama PVT de uma substância pura e sua projeção no plano PT.	48
Figura 2	Parâmetros de solubilidade de diferentes líquidos e fluidos supercríticos na série eluotrópica de Giddings.	59
Figura 3	Comparação da série eluotrópica de Giddings (1968), esquerda, com a recente escala empírica da força de solvente (BERGER; SMITH, 1995), baseada no corante solvatocrômico vermelho nilo. Giddings avaliou o dióxido de carbono como sendo próximo ao isopropanol quanto a sua força solvente, e baseado no corante solvatocrômico a sua força é próxima à do pentano. Fonte: Adaptado de Anton (1997).	60
Figura 4	Solubilidade (em fração molar) do naftaleno em etileno supercrítico em função da pressão, à 12 °C e 35 °C. (T_c etileno = 9,3 °C).	61
Figura 5	Solubilidade do beta-caroteno em CO ₂ supercrítico como função da densidade a diferentes temperaturas.	62
Figura 6	Solubilidade da vitamina K ₁ em CO ₂ supercrítico como função da densidade a diferentes temperaturas.	63
Figura 7	Solubilidade do α -pineno em CO ₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.	64
Figura 8	Solubilidade do limoneno em CO ₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.	65
Figura 9	Solubilidade da cânfora em CO ₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.	66

Figura 10	Solubilidade do 1,8 cineol (eucaliptol) em CO ₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.	67
Figura 11	Densidade do CO ₂ para as temperaturas de (40, 50 e 60) °C.	68
Figura 12	Número de publicações com o título (Supercritical Fluid Extraction), pesquisado em 06-2012.	71
Figura 13	Número de publicações com o título (Supercritical Fluid Extraction 'e' <i>rosmarinus officinalis</i>), pesquisado em 06-2012.	71
Figura 14	Esquema funcional de um processo contínuo SMB.	78
Figura 15	A Folhas frescas de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>). B Microscopia eletrônica de varredura parte inferior da folha de alecrim (seca). C corte na seção transversal da folha (seca).	86
Figura 16	Microscopia eletrônica de varredura da folha de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>). a Tricoma glandular peltado (PT) e não-glandular (NT). b Superfície abaxial da folha com inúmeros tricomas (peltado e capitado) bem como tricomas não-glandulares no veio central da folha (MT). c Vista detalhada do tricoma peltado (PT) e do capitado (CT) na superfície adaxial da folha corte. d Tricoma capitado (CT) cercado por estômatos (ST), cera epicuticular (EW) na epiderme. e Glândula peltada madura (PT). f Vista detalhada do tricoma peltado iniciando a ruptura da cutícula e o tricoma peltado maduro após a separação do saco cuticular (CS).	88

Figura 17	Fluxograma simplificado das etapas realizadas nesse trabalho, envolvendo, extração, avaliação antimicrobiana, determinação da composição química dos extratos e da fração aromática, fracionamento, quantificação química dos compostos majoritários, separação e purificação, e avaliação econômica desses processos. . .	96
Figura 18	Unidade de extração SFE-I (LCP - UFSC). TQ - Tanque pulmão, E - Extrator, SO - Separador de óleo	100
Figura 19	Unidade de extração SFE-II (LCP - UFSC). B - Bomba HPLC, E - Extrator, BP - Válvula Backpressure, H - Aquecimento	101
Figura 20	Unidade de extração SFE-III (LRGP - EN-SIC). E - Extrator, S - Separador 1, 2 e 3. . . .	102
Figura 21	Aparelho tipo Clevenger utilizado na hidrodestilação do alecrim.	103
Figura 22	Um frasco de <i>headspace</i> contendo uma amostra líquida: (A) volume da amostra líquida, (G) volume da fase gasosa.	111
Figura 23	Variação da densidade do CO ₂ ao longo da extração fracionada em degrau a 35°C - SFE-II.	116
Figura 24	Exemplo da curva de calibração (<i>Fonte: Shimadzu GC Operation book</i>).	121
Figura 25	Banho termostático com ultrassom, Elma-Transsonic TI-H-20 (Alemanha).	126
Figura 26	Exemplo de três diferentes escalas de colunas utilizadas em desenvolvimento de processos de separação.	143
Figura 27	Alecrim seco, corte da secção transversal da folha, imagem obtida com MEV. Tricomas glandulares peltados (PT) juntamente com tricomas não-glandulares (NT) localizados na abaxial da folha.	148

Figura 28	Alecrim seco, corte da secção transversal da folha, detalhe na região de localização dos tricomas glandulares peltados (verde escuro), imagem obtida com MEV e colorido via software. .	149
Figura 29	Microscopia eletrônica de varredura, MEV, dos tricomas glandulares peltados do alecrim, sem tratamento e após tratamento extrativo com CO ₂ supercrítico.	150
Figura 30	Curvas de extração de alecrim, obtidas na unidade SFE-II, com vazão constante 1,8 mL/min, (○) 150 bar e 35 °C, (△) 150 bar e 55 °C, (□) 250 bar e 35 °C, (◇) 250 bar e 55 °C.	154
Figura 31	Ensaio de avaliação antimicrobiana do extrato de alecrim	159
Figura 32	Contagem de bactérias lácticas totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 12 °C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.	161
Figura 33	Contagem de psicrófilos totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 12 °C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.	162
Figura 34	Contagem de bactérias lácticas totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 7°C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.	163
Figura 35	Contagem de psicrófilos totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 7°C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.	164
Figura 36	Contagem de psicrófilos totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 7°C, tratada com Alecrim SC e na amostra.	164
Figura 37	Cromatogramas de <i>headspace</i> (60°C) dos tratamentos, ASF, ASM, ASM-PE, EXT-SC e OE-HD.	169

Figura 38	Comparativo entre cromatogramas GC-FID de <i>headspace</i> (60°C) das amostras AF (—) e EXT-SC (—) com o de via líquida do EXT-SC (ii) representando o pico do solvente (etanol e uma impureza), tempos de retenção entre 0,50 e 5,00 min.	171
Figura 39	Gráfico da dispersão do log(Area) <i>vs</i> n° de coletas.	172
Figura 40	Seis cromatogramas agrupados, análise MHE dos padrões, pico do α -pineno, tempo de retenção 7,739 min.	173
Figura 41	Cromatogramas GC-FID de <i>headspace</i> (80°C) das amostras de folhas frescas (FF) e folhas secas (FS).	173
Figura 42	Cromatogramas GC-FID de <i>headspace</i> (80°C) da amostra de folhas frescas (FF).	174
Figura 43	Varição da densidade do CO ₂ ao longo da extração fracionada em degrau a 35 °C - SFE-II.	178
Figura 44	Cromatogramas (GC-FID) das frações provenientes da extração fracionada em degrau a 35 °C - SFE II.	180
Figura 45	Fotografia de amostras obtidas no experimento de ESCF n°25, da esquerda para a direita (separadores 1, 2 e 3), da esquerda para direita, os primeiros três tubos de ensaio são do extrato puro e os outros três são do procedimento de recuperação com etanol.	183
Figura 46	Espectro UV do padrão de ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich).	191
Figura 47	Cromatograma característico obtido no HPLC 2, extração com 30 % etanol à 30°C com ultrassom.	191
Figura 48	Gráfico da dispersão da concentração de AR das extrações realizadas com ultrassom.	192
Figura 49	Gráfico da dispersão da concentração de AR das extrações realizadas em batelada normal.	193

Figura 50	Concentração de AR (mg/g) das extrações realizadas com ultrassom.	194
Figura 51	Concentração de AR (mg/g) das extrações realizadas em batelada normal.	194
Figura 52	Cromatograma característico obtido no HPLC-Preparativo, para o padrão de AR ($1000 \mu g/mL$), comprimento de onda de 330 nm	201
Figura 53	Cromatograma obtido no HPLC-Preparativo Varian Dynamax, para o extrato de alecrim, comprimento de onda de 330 nm , intervalos de tempo das frações recuperados, fração 2 - 6,1 a 7,2 min ; fração 3 - 8,5 a 9,1 min ; fração 4 - 10,8 a 11,2 min	202
Figura 54	Cromatogramas (HPLC-MS) agrupados das coletas dos picos obtidos no HPLC-Preparativo, comprimento de onda de 330 nm , intervalos de tempo dos picos recuperados, pico 2 - 6,1 a 7,2 min ; pico 3 - 8,5 a 9,1 min ; pico 4 - 10,8 a 11,2 min	203
Figura 55	Espectro do massa do AR Padrão e da linha de base do cromatograma obtido em HPLC-MS.	204
Figura 56	Espectro do massa do AR Padrão e da linha de base do cromatograma obtido em HPLC-MS.	204
Figura 57	Cromatograma obtido no HPLC-Preparativo, para o extrato de alecrim, comprimento de onda de 330 nm , pico de AR detectado em 6,391 min	205
Figura 58	Distribuição dos custos integrantes no custo de manufatura do extrato de alecrim pelas respectivas unidades de extração do mercado Americano, onde FC é o custo fixo, GC são custos gerais, UC é o custo das utilidades, LC é custo da mão-de-obra, RMC é o custo da matéria-prima (baseado no valor de aquisição, Vmp, de 5,90 $US\$/kg$) e CLC é custo respectivo a reposição de CO_2	211

Figura 59	Previsão do custo de manufatura do extrato de alecrim ($V_{mp} = 5,90 \text{ US\$/kg}$) sobre o rendimento (%) do processo em cada uma das unidades (5 a 1000 <i>litros</i>)	212
Figura 60	Distribuição dos custos integrantes no custo de manufatura do ácido rosmarínico (AR) pelas respectivas unidades de separação, onde FC é o custo fixo, GC são custos gerais, UC é o custo das utilidades, LC é custo da mão-de-obra, RMC é o custo da matéria-prima (solventes e fase estacionária) e WTC é custo do tratamento de resíduos.	221
Figura 61	Diagrama de fluxo do processo de obtenção e separação dos compostos bioativos do alecrim.	223

Lista de tabelas

Tabela 1	Propriedades críticas dos fluidos de interesse em processos supercríticos.	49
Tabela 2	Comparação das propriedades físicas do gás, líquido e do fluido supercrítico.	50
Tabela 3	Pressão limite de esteróides com diversos substitutos	53
Tabela 4	Composição química dos extratos de alecrim. AM - atividade antimicrobiana, AO - atividade antioxidante.	89
Tabela 5	Característica das unidades de extração supercrítica SFE's utilizadas.	102
Tabela 6	Parâmetros de cromatografia gasosa utilizados na Primeira etapa	105
Tabela 7	Solução padrão para quantificação em <i>headspace</i> .113	
Tabela 8	Parâmetros de cromatografia gasosa utilizados na quantificação da fase gasosa - MHE.	114
Tabela 9	Tabela de experimentos de fracionamento, SFE-III	117
Tabela 10	Solução estoque de padrão interno, GC-FID . .	120
Tabela 11	Solução estoque de compostos padrão, GF-FID	121
Tabela 12	Parâmetros de cromatografia gasosa utilizados na Quinta etapa	123
Tabela 13	Extração sólido-líquido das folhas de alecrim .	125
Tabela 14	Extração sólido-líquido das folhas de alecrim auxiliada por ultrassom	126
Tabela 15	Métodos avaliados no equipamento HPLC 1 . .	127
Tabela 16	Metodologia utilizada no HPLC 2	128
Tabela 17	Métodos avaliados no equipamento HPLC-Preparativo	131
Tabela 18	Metodologia utilizada no HPLC-MS	133
Tabela 19	Quantidades aproximadas dos custos indiretos	136

Tabela 20	Custo da unidade de ESC no mercado norte americano e chinês.	137
Tabela 21	Custos das matérias-primas	138
Tabela 22	Custo das unidades de separação cromatográficas. Adaptado de (PYNNONEN, 1998).	142
Tabela 23	Colunas referentes a cada uma das escalas dos cenários avaliados.	143
Tabela 24	Custos da fase estacionária (C_{18}) para cada uma das escalas.	144
Tabela 25	Número de pessoal para operação de cada unidade.	145
Tabela 26	Caracterização do leito de extração	147
Tabela 27	Condições de extração - SFE-I - alecrim.	151
Tabela 28	ANOVA, extração SFE-I 35 °C	151
Tabela 29	Condições de extração - SFE-II, variando a vazão.	152
Tabela 30	Condições de extração - SFE-II.	153
Tabela 31	Hidrodestilação - alecrim.	154
Tabela 32	Caracterização cromatográfica (GC-FID) dos extratos (SFE-I) e hidrodestilado de alecrim (HD), expresso em área absoluta e área % total dos compostos detectados.	156
Tabela 33	Halo de inibição do extrato de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>), nas concentrações de 100% e 50% (v/v), frente às bactérias gram-positivas testadas.	158
Tabela 34	Contagem de microrganismos em presunto armazenado a 12°C	165
Tabela 35	Contagem de microrganismos em presunto armazenado a 7°C.	165
Tabela 36	Análises cromatográficas de headspace estático (HS-GC-FID) realizadas.	167
Tabela 37	Cromatograma do headspace estático (GC-FID) das amostras, na temperatura de 60°C, expresso em área absoluta dos compostos detectados	170

Tabela 39	Quantidade mássica de composto presente na fase vapor das amostras.	173
Tabela 40	Valores de área absoluta dos picos do cromatograma das frações coletadas na extração fracionada em degrau a 35°C - SFE II.	179
Tabela 42	Condições operacionais (P - pressão [bar] e T - temperatura [°C]) do fracionamento com separadores ciclônicos	181
Tabela 43	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 20	183
Tabela 44	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 21	184
Tabela 45	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 22	184
Tabela 46	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 23	184
Tabela 47	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 24	185
Tabela 48	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 25	185
Tabela 49	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 26	185
Tabela 50	Composição química do extrato de alecrim (ext) e do recuperado etanólico (rec) obtidos nos separadores na ESCF nº 27	186
Tabela 51	Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 30 °C assistida por ultrassom.	195
Tabela 52	ANOVA, extração de AR em batelada assistida por ultrassom a 30 °C	196

Tabela 53	Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 30 °C em batelada normal.	196
Tabela 54	ANOVA, extração de AR em batelada normal a 30 °C	196
Tabela 55	Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 60 °C em batelada normal.	197
Tabela 56	ANOVA, extração de AR em batelada normal a 60 °C	197
Tabela 57	Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 60 °C em batelada auxiliada por ultrassom.	197
Tabela 58	ANOVA, extração de AR em batelada assistida por ultrassom a 60 °C	198
Tabela 59	Avaliação da influência da temperatura na extração de AR na extração auxiliada por ultrassom.	199
Tabela 60	Avaliação da influência da temperatura na extração de AR na extração em batelada normal.	200
Tabela 61	Parâmetros utilizados para scale-up, na avaliação econômica.	208
Tabela 62	Custo de utilidades para as unidades de extração.	210
Tabela 63	Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 5,90 <i>US\$/kg</i> para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Americana.	211
Tabela 64	Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 3,00 <i>US\$/kg</i> para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Americana.	212
Tabela 65	Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 5,90 <i>US\$/kg</i> para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Chinesa.	213

Tabela 66	Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 3,00 <i>US\$/kg</i> para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Chinesa.	213
Tabela 67	Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 3,00 <i>US\$/kg</i> para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Americana.	214
Tabela 68	Condições e bases econômicas para o processo de separação nas escalas.	219
Tabela 69	Custos diretos do processo de separação nos diferentes cenários.	220

Lista de símbolos

Símbolos Latinos

A_1^*	Área do pico calculada, em substituição ao primeiro ponto experimental	$[]$
A_1	Área do pico obtido na primeira medida	$[]$
A_{ex}	Área do pico do padrão	$[]$
A_i	Área do pico do analito i	$[]$
$Area_x$	Área de pico do composto x	$[]$
C_v	Coefficiente de variação	
C_x	Concentração do composto x	$[mg.mL^{-1}]$
d	Diâmetro de extrator	$[m]$
D_p	Diâmetro de partículas	$[mm]$
F	Quantidade de matéria-prima por batelada	$[kg]$
H	Altura do leito de extração	$[m]$
Hr	Horas operacionais por ano	$[h.ano^{-1}]$
L	comprimento da coluna ou do leito de partículas	$[mm]$
m_{planta}	Massa de planta	$[kg]$
P_c	Pressão no ponto crítico	$[bar]$
PI	Padrão Interno	
q	Declividade ($\ln A_i$)	$[]$
Q_{CO_2}	Vazão de CO_2	$[kg.h^{-1}]$
FCI	Investimento inicial	$[US\$]$
LC	Custo operacional	$[US\$.ano^{-1}]$
RMC	Custo da matéria-prima	$[US\$.ano^{-1}]$
Rt	Tempo de retenção (<i>Retention time</i>)	$[min]$

SR	Sensibilidade relativa (<i>Relative sensitivity</i>)	
SRS	Sensibilidade relativa padrão (<i>Standard Relative Sensitivity</i>)	
T	Temperatura	[°C]
t_B	Tempo de extração (batelada)	[h]
UC	Custo de utilidades	[US\$.ano ⁻¹]
WTC	Custo do tratamento de resíduos	[US\$.ano ⁻¹]
$V_{extrator}$	Volume do extrator	[m ³]
Vmp	Valor de aquisição da matéria-prima	[US\$.kg ⁻¹]
W_i	Massa do analito i	[mg]
W_{ex}	Massa do padrão	[mg]
\overline{X}	Média das amostras	
x	composto x	
y^*	Concentração de soluto no fluido supercrítico	[g.kg ⁻¹]

Símbolos Gregos

ΔP	Perda de carga	[Pa]
δ	Parâmetro de solubilidade	[cal.cm ⁻³]
ε	Porosidade	[]
κ_x	Fator de Resposta	
μ	viscosidade do fluido	[Pa.s]
ν_0	velocidade superficial	[mm.s ⁻¹]
ρ	Densidade do fluido	[kg.m ⁻³]
ρ_a	Densidade aparente	[kg.m ⁻³]
ρ_L	Densidade do leite	[kg.m ⁻³]
ρ_s	Densidade do sólido	[kg.m ⁻³]
ρ_{fs}	Densidade do fluido supercrítico	[kg.m ⁻³]
σ	Desvio Padrão	

Lista de abreviaturas

AM antimicrobiano

AO antioxidante

AR ácido rosmarínico

ASF alecrim seco (folhas inteiras)

ASM alecrim seco e moído

ASM-PE alecrim seco e moído pós extração SC

AACEI *Association for the Advancement of Cost Engineering International*

COM custo de manufatura (*Cost of Manufacturing*)

DAD *Diode Array Detector*

EXT-SC extrato supercrítico de alecrim

ENSIC *Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques*

ESCF Extração Supercrítica Fracionada

ESC Extração Supercrítica

FCI capital fixo de investimento (*Fixed capital investment*)

FID *Flame Ionization Detector*

FF folhas frescas

FS folhas secas

FSC Fluido Supercrítico

GC *Gas Chromatography*

HD Hidrodestilação

HPLC *High Pressure Liquid Chromatography*

INPL *Institut National Polytechnique de Lorraine - Nancy*

LRGP *Laboratoire Réactions et Génie des Procédés*

LCP Laboratório de Controle de Processos

pSFC Cromatografia Supercrítica com Coluna Empacotada

MHE *Multiple Headspace Extraction*

OE-HD óleo essencial de hidrodestilação do alecrim

PDA *Photodiode Array Detector*

RO *Rosmarinus officinalis*

SC supercrítico

SFE *Supercritical Fluid Extraction*

SFEF *Supercritical Fluid Fractionation*

SFC *Supercritical Fluid Chromatography*

SMB *Simulated Moving-Bed*

UFC/g *Unidades Formadoras de Colônias por grama*

Sumário

Introdução	41
1 Objetivos	45
1.1 Objetivo geral	45
1.2 Objetivos específicos	45
2 Revisão Bibliográfica	47
2.1 Fluidos supercríticos	47
2.2 Propriedades dos fluidos supercríticos	50
2.2.1 Polaridade	50
2.2.2 Solubilidade	52
2.2.3 O poder solvente do CO ₂	53
2.2.4 Solubilidade de compostos dos óleos essenciais	55
2.3 Extração com fluido supercrítico	69
2.4 Separação e purificação de compostos naturais	74
2.4.1 Leito Móvel Simulado (SMB)	77
2.4.2 Cromatografia Supercrítica	79
2.4.2.1 Cromatografia Supercrítica com coluna empacotada (pSFC)	80
2.4.3 Aplicações em produtos naturais	81
2.5 Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	85
2.5.1 Composição química do extrato de alecrim	87
2.5.2 Propriedades e compostos ativos do alecrim	87
2.5.3 Separação e purificação do ácido rosmarínico	91
2.6 Considerações sobre o estado da arte	93
3 Materiais e métodos	95
3.1 Introdução	95
3.2 PRIMEIRA etapa	97
3.2.1 Preparação da matéria-prima	97

3.2.2	Caracterização da matéria-prima (leito de extração)	98
3.2.3	Procedimento de extração supercrítica (ESC)	98
3.2.4	Procedimento de extração por hidrodestilação	102
3.2.5	Caracterização do extrato	103
3.2.5.1	Cromatografia Gasosa	103
3.2.5.2	Condições de análise GC-FID	104
3.2.5.3	Condições de análise GC-MS	104
3.3	SEGUNDA etapa	106
3.3.1	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos <i>in vitro</i>	106
3.3.2	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em presunto cozido embalado a vácuo, comercial	107
3.4	TERCEIRA etapa	109
3.4.1	Determinação dos compostos presentes no aroma do alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	109
3.4.2	Cromatografia Gasosa de <i>headspace</i> estático	109
3.4.3	Múltipla Extração de <i>Headspace</i> (MHE - <i>Multiple HeadSpace Extraction</i>)	110
3.4.3.1	Análise quantitativa do <i>headspace</i> - Método do padrão externo em MHE	112
3.4.3.2	Cromatografia Gasosa de <i>headspace</i> estático - MHE	113
3.5	QUARTA etapa	115
3.5.1	Extração supercrítica fracionada (ESCF) em degraus de pressão	115
3.5.2	Extração supercrítica fracionada (ESCF) em separadores ciclônicos	116
3.5.2.1	Cromatografia gasosa	117
3.5.2.2	Análise quantitativa - Método do padrão interno	118
3.5.2.3	Preparação do padrão interno	119
3.5.2.4	Preparação dos analitos padrão	120
3.5.2.5	Curvas de calibração	120

	3.5.2.6	Preparação das amostras	122
	3.5.2.7	Condições de análise GC-FID . .	122
	3.5.2.8	Condições de análise GC-MS . .	122
3.6	QUINTA etapa		124
	3.6.1	Procedimentos de extração sólido-líquido .	124
	3.6.2	Extração em batelada normal	124
	3.6.3	Extração em batelada auxiliada por ultrassom	125
	3.6.4	Determinação da concentração ácido rosmarínico via HPLC-Analítico	125
	3.6.4.1	Preparação da solução padrão e validação do método	128
	3.6.4.2	Soluções padrão e curvas de calibração	129
	3.6.5	Separação e purificação do ácido rosmarínico via HPLC-Preparativo	130
	3.6.5.1	Identificação do ácido rosmarínico por HPLC-MS	132
3.7	SEXTA etapa		134
	3.7.1	Avaliação econômica do processo de extração supercrítica	135
	3.7.1.1	Determinação do custo de manufatura (COM)	135
	3.7.1.2	Custos indiretos	135
	3.7.1.3	Investimento inicial (FCI)	136
	3.7.1.4	Custos diretos	137
	3.7.1.5	Custo operacional (LC)	137
	3.7.1.6	Custo de utilidades (UC)	137
	3.7.1.7	Custo da matéria-prima (RMC) .	138
	3.7.1.8	Custo do tratamento de resíduos (WTC)	138
	3.7.2	Avaliação econômica do processo de separação	139
	3.7.2.1	Custos diretos	144
	3.7.2.2	Custo operacional (LC)	145
	3.7.2.3	Custo de utilidades (UC)	145
	3.7.2.4	Custo da matéria-prima (RMC) .	146

3.7.2.5	Custo do tratamento de resíduos (WTC)	146
---------	---	-----

4 Resultados e discussão 147

4.1	PRIMEIRA etapa	147
4.1.1	Caracterização da matéria-prima (leito de extração)	147
4.1.2	Extração supercrítica de alecrim	150
4.1.3	Extração de alecrim por hidrodestilação	153
4.1.4	Caracterização dos extratos e do óleo essencial	155
4.1.5	Considerações sobre a PRIMEIRA etapa	157
4.2	SEGUNDA etapa	158
4.2.1	Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos	158
4.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em presunto cozido embalado a vácuo, comercial	160
4.2.3	Considerações sobre a SEGUNDA etapa	166
4.3	TERCEIRA etapa	167
4.3.1	Determinação dos compostos presentes no aroma do Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	167
4.3.1.1	Análise quantitativa por MHE	171
4.3.2	Considerações sobre a TERCEIRA etapa	174
4.4	QUARTA etapa	176
4.4.1	Fracionamento em degrau do extrato de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	177
4.4.2	Fracionamento do extrato de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>) com separadores ciclônicos.	178
4.4.3	Considerações sobre a QUARTA etapa	187
4.5	QUINTA etapa	189
4.5.1	Extração sólido-líquido	189
4.5.1.1	Influência da concentração de etanol	192
4.5.1.2	Influência do pré-tratamento da matéria-prima	194

4.5.1.3	Influência da temperatura	198
4.5.2	Separação e purificação do ácido rosmarínico via HPLC-Preparativo	200
4.5.3	Considerações sobre a QUINTA etapa . .	206
4.6	SEXTA etapa	207
4.6.1	Avaliação econômica do processo de extração supercrítica	207
4.6.2	Avaliação econômica do processo de extração e separação do ácido rosmarínico .	215
4.6.3	Desenvolvimento do processo de separação de compostos ativos	222
4.6.4	Considerações sobre a SEXTA etapa . . .	224
Conclusão		227
4.7	Sugestões para trabalhos futuros	230
Referências		233
Apêndices		261
APÊNDICE A Trabalhos publicados e enviados		263
A.1	Artigos completos enviados para periódicos	263
A.2	Trabalhos completos publicados em anais de congresso	263

Introdução

A obtenção de compostos naturais ativos provenientes de sistemas biológicos (plantas, sementes, frutos, etc.) tornou-se o foco de muitas pesquisas de desenvolvimento tecnológico da atualidade na indústria química e de alimentos. Isto se dá, principalmente, com a conscientização dos benefícios para a saúde trazidos pela ingestão de alimentos enriquecidos com compostos bioativos, como os carotenóides, tocoferóis, tocotrienóis, flavonóides, entre outros. Ainda, tem aumentado significativamente o interesse da indústria em encontrar antioxidantes, antimicrobianos, corantes e outras substâncias naturais como uma alternativa às substâncias sintéticas, que são utilizadas hoje em alimentos prontos. Essas ideias são apoiadas pelos consumidores, também preocupados com a segurança dos alimentos que contém inúmeras substâncias químicas sintéticas, principalmente pelo fato delas serem suspeitas de promover efeitos negativos à saúde (RAMÍREZ et al., 2007; PEREIRA; MEIRELES; ANGELA, 2010).

Muitas das ervas e condimentos que são utilizados para aromatizar os alimentos têm sido pesquisados e avaliados como fontes de compostos antioxidantes e antimicrobianos naturais, dentre esses, o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), que é utilizado como tempero de alimentos, em cosméticos e na medicina tradicional por sua atividade hepatoprotetora e antitumoral (SLAMENOVÁ et al., 2002). Ainda, essa planta é uma das mais utilizada na indústria de alimentos, (PEREDA, 2005). No alecrim a atividade antioxidante tem sido atribuída a diferentes diterpenos fenólicos, como o carnosol, ácido carnósico, rosmadiol, rosmanol, ácido rosmarínico, epirosmanol e metil carnosato. A atividade antimicrobiana do alecrim tem sido sugerida pela presença de ácido carnósico e ácido rosmarínico e alguns compostos do óleo essencial, principalmente o borneol e a cânfora (CUVELIER; RICHARD; BERSET, 1996; IBÁÑEZ et al., 1999; ANGIONI et al., 2004; RAMÍREZ et al., 2005; GENENA et al., 2008; KLANCNIK et al., 2009;

ZIBETTI; BOLZAN; MARANGONI, 2009).

Embora se saiba que esses compostos naturais ativos estão presentes na forma de misturas complexas nos extratos das plantas, a sua separação e purificação é uma tarefa difícil e, por sua vez, onerosa. Estes processos constituem um problema tecnológico importante, pois vários compostos naturais são degradados ou se transformam em substâncias indesejáveis em temperaturas relativamente baixas, impossibilitando a utilização de métodos de separação tradicionais, como a destilação. Separar esses compostos químicos naturais devido à complexidade da mistura em que se encontram é um desafio, além de haver alto custo na implementação de um processo separativo. Paralelamente, métodos convencionais de extração com solventes orgânicos também apresentam graves inconvenientes, pois mesmo pequenas quantidades residuais destes solventes no material final podem ser incompatíveis com sua utilização para consumo humano. A necessidade de tratamento posterior dos efluentes gerados adiciona mais uma restrição ao processo.

Sabe-se que é possível separar compostos de alto valor agregado, ou seja, compostos naturais ativos com eficiência e relativo baixo custo operacional, quando se utiliza o CO_2 denso como fase móvel (solvente) no processo de separação. Em contra partida o investimento inicial em equipamentos operando nas condições necessárias para esse fluido se torna um complicante. Porém, é necessário um amplo estudo para determinação das condições operacionais, procedimentos e equipamentos para melhor atender à essas expectativas. Diante deste problema, a utilização de processos de extração com fluido supercrítico, tem sido considerada uma alternativa interessante, uma vez que os solventes utilizados são normalmente inócuos, e o processo pode ser conduzido em temperaturas próximas à ambiente, onde a recuperação dos compostos de interesse é feita em condições moderadas, evitando-se assim danos e contaminação aos produtos. Devido a essas características promissoras, o estudo deste tema tem sido foco de um grande número de trabalhos científicos (SIE; RIJNDERS, 1967; DI-GIACOMO et al., 1989; MATOS et al., 1989; LIANG; YEH, 1991; REVERCHON; SENATORE, 1992; REVERCHON, 1992; SARRADE;

GUIZARD; RIOS, 2003; RAMÍREZ et al., 2004; TSAO; DENG, 2004; RAMÍREZ et al., 2005; RAMÍREZ et al., 2007; TAYLOR, 2009), com destaque para trabalhos teóricos e/ou experimentais a respeito de aspectos fenomenológicos do problema, especialmente investigações sobre equilíbrio de fases e transferência de massa.

Os resíduos sólidos gerados em processos como os de extração (indústria química e de alimentos) são normalmente reutilizados em co-geração de energia e em alguns casos são fontes alternativas à obtenção de insumos. Os resíduos sólidos vegetais da indústria de extração de óleos (extração sólido-líquido, prensagem), óleos essenciais (hidrodestilação, arraste à vapor) ou extratos supercríticos são também uma fonte promissora de compostos ativos a serem explorados, devido ao volume de material gerado e suas características particulares (composição química) (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008). A extração, separação, e purificação de compostos fenólicos naturais com o objetivo de serem utilizados como fármacos, alimentos funcionais e nutracêuticos, proporcionam uma grande oportunidade econômico-ambiental adicional (SOTO et al., 2011). Nos casos onde a extração com solventes é empregada para a recuperação de compostos fenólicos, apresentam uma seletividade ainda deficiente. Dessa forma purificações adicionais são necessárias, envolvendo custos adicionais e geração de novos resíduos. Dessa forma os problemas ambientais causados pelo uso de solventes orgânicos (toxicidade) têm estimulado o desenvolvimento de tecnologias, com menor consumo, maior seletividade, eficiente e ambientalmente correta (SOTO et al., 2011).

Portanto, a reutilização de resíduos agroindustriais pode ser originário de vários possíveis produtos, como extratos de alto valor para diferentes aplicações, como, por exemplo, o uso das frações voláteis de óleo nas indústrias de alimentos (aroma, sabor) e ainda o uso de frações fenólicas em alimentos ou de uso farmacêutico (BRAGA et al., 2008). Porém esse tema ainda não atingiu o seu potencial, visto que poucas publicações englobam essa cadeia de processamentos e beneficiamento. Embora essas ideias sejam prospectadas pela iniciativa privada, que buscam melhoria e maior lucratividade em seus processos, impulsionados pelas

organizações governamentais que visam o desenvolvimento durável, com foco em manutenção e preservação do meio-ambiente. Assim, torna-se necessário o estudo sistemático para obtenção de compostos bioativos, de modo econômico e sustentável, visando sua aplicação industrial.

Estrutura do documento

O documento encontra-se organizado em seis capítulos, o primeiro capítulo apresentou a introdução do trabalho, no segundo capítulo está apresentado os objetivos da presente tese de doutorado. No terceiro capítulo a revisão bibliográfica a respeito das bases teóricas utilizadas ao longo do trabalho, que compreendem basicamente, os fluidos supercríticos, a matéria-prima utilizada e seus compostos, assim como as técnicas de separação. Nos capítulos 4 e 5, estão apresentados os materiais e métodos e os resultados, respectivamente. O trabalho foi subdividido em 6 etapas distintas. A primeira etapa se refere a obtenção do extrato supercrítico e do óleo essencial que foi utilizado em testes de atividade antimicrobiana, *in vitro* e diretamente em contato com o alimento, na segunda etapa. Na terceira etapa foi caracterizada a fração volátil de *headspace* da matéria-prima, a fim de caracterizar o seu aroma em termos qualitativos e quantitativos. Na quarta etapa foram testadas técnicas de fracionamento de compostos durante a extração utilizando dois modos operacionais em duas unidades de extração supercrítica. A quinta etapa descreve as técnicas utilizadas para extração de um composto fenólico a partir do resíduo vegetal e sua separação com a utilização de técnicas cromatográficas, em escala analítica e preparativa (*scale-up*). A sexta e ultima etapa foi a da avaliação econômica dos procedimentos estudados, formatados para a obtenção dos compostos ativos presentes na matriz vegetal. No sétimo e ultimo capítulo estão apresentadas as conclusões gerais e, ao final do documento as publicações realizadas e submetidas.

1 Objetivos

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um processo de obtenção de compostos bioativos do alecrim com tecnologias limpas de extração e separação, ambientalmente seguros e economicamente atrativo.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar os compostos bioativos da matriz vegetal *Rosmarinus officinalis* (RO);
- Identificar os processos de extração e separação ambientalmente corretos;
- Determinar as condições experimentais de extração que permitam a retirada de compostos ativos da matriz vegetal;
- Determinar a atividade antimicrobiana do extrato de RO *in vitro*;
- Determinar e comparar a atividade antimicrobiana do extrato de RO em alimento cárneo industrializado, presunto cozido embalado à vácuo;
- Determinar os compostos responsáveis pelo aroma característico do RO;
- Quantificar os compostos majoritários na matriz vegetal;
- Avaliar métodos e metodologias de separação dos compostos ativos de interesse;
- Separar os compostos ativos utilizando solventes de baixo impacto ambiental, renováveis e de grau alimentício;

- Avaliar a ampliação de escala do processo de separação;
- Realizar uma avaliação econômica dos processos envolvidos na obtenção dos compostos de interesse.

2 Revisão Bibliográfica

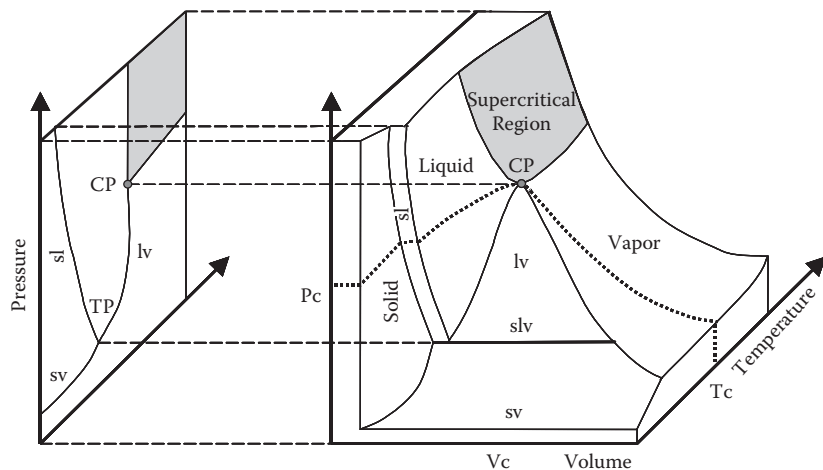
Esse capítulo traz uma visão geral dos processos de extração e separação aplicado aos produtos de origem natural, a base teórica de suas aplicações, seu desenvolvimento e utilizações nos dias de hoje. Tem como objetivo elucidar as informações sobre fluidos supercríticos, mais especificamente o CO_2 , descrever sobre o equilíbrio de fases, métodos de extração e a influência dos seus parâmetros operacionais, métodos de separação de compostos pelas técnicas de cromatografia, suas aplicações e utilidades na indústria química e de alimentos, assim como apresentar as características da matriz vegetal *Rosmarinus officinalis*.

2.1 Fluidos supercríticos

Os diferentes estados físicos de uma substância pura podem ser visualizados em um diagrama tridimensional de pressão-volume-temperatura (P-V-T), como mostrado na Figura 1. A superfície representa os diferentes estados, sólido, líquido ou vapor, que corresponde a valores determinados de pressão e temperatura. De acordo com a regra de fases, as regiões de duas fases (sólido-líquido, sólido-vapor e líquido-vapor) de uma substância pura possuem apenas um grau de liberdade. Quando a temperatura e a pressão estão acima de seu valor crítico, é considerado que o sistema está na região supercrítica. Próximo às condições críticas, as propriedades do sistema são altamente sensíveis à pressão e temperatura: esta região é considerada quase crítica. Normalmente, o solvente supercrítico é aplicado a uma temperatura próxima ao seu valor crítico, sob uma pressão suficiente alta para tornar sua densidade maior do que a densidade crítica do fluido. Por definição o estado supercrítico é caracterizado pelo desaparecimento de uma interface de separação do estado líquido e gasoso. O que ocorre somente acima de certa

pressão e temperatura (MARTINEZ., 2008).

Figura 1 – Diagrama PVT de uma substância pura e sua projeção no plano PT.



Fonte: Martinez. (2008)

Francis (1954) fez uma contribuição significativa no que se refere às propriedades do CO_2 , estudando seu comportamento frente a um grande número de solutos. Ele mostrou que o CO_2 líquido é miscível em alcanos de até 10 carbonos, enquanto a faixa de miscibilidade aumenta para o etano até 20 e para o propano até 35 carbonos. Portanto, estes solventes mostram uma seletividade para materiais de relativo baixo peso molecular. Stahl e Quirin (1983) demonstraram a extratibilidade de uma ampla faixa de produtos naturais utilizando o CO_2 , onde hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos lipofílicos de baixa massa molecular e polaridade, são facilmente extraídos; a introdução de grupos funcionais polares, hidroxila ou carboxila tornam a extração mais difícil e complexa; açúcares e aminoácidos não podem ser extraídos; efeitos de fracionamento são possíveis se houver uma diferença marcante na massa, pressão de vapor ou polaridade dos constituintes da mistura.

Uma boa característica dos solventes de baixa temperatura

crítica (CO_2 , etano e propano), quando comparado aos solventes líquidos convencionais, é a capacidade de operar a moderadas temperaturas e possuir baixo poder solvente, Figura 1. Portanto, selecionando-se cuidadosamente a pressão e temperatura de operação, frações seletivas podem ser extraídas das matrizes vegetais, como óleo essencial, alcalóides, lipídios ou óleos resinas. Em função dessa característica esses solventes são preferidos na indústria farmacêutica e de produtos naturais. Outra vantagem de solventes de baixa temperatura crítica é a facilidade em sua separação do extrato, (PEREDA; BOTTINI; BRIGNOLE, 2009).

Tabela 1 – Propriedades críticas dos fluidos de interesse em processos supercríticos.

Fluido	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (kg/m^3)
Dióxido de carbono	73,8	31,1	468
Etano	48,8	32,2	203
Etileno	50,4	9,3	200
Propano	42,5	96,7	220
Propileno	46,2	91,9	230
n-Pentano	33,7	196,6	232
Benzeno	48,9	289	302
Tolueno	41,4	318,6	290
Amonia	112,1	132,5	240
Água	22,5	374,2	272
Metanol	79,5	240	275
Etanol	63,9	243,1	280

Fonte: Castro, Valcárcel e Tena (1994)

As interações entre soluto na fase líquida e o fluido supercrítico podem originar uma segunda fase líquida, o que aumenta o processo de seletividade e separa reações químicas *in situ* (ECKERT; CHANDLER, 1998). Um melhor entendimento das propriedades supercríticas do solvente serão obtidas após as considerações do comportamento do equilíbrio de fases de sistemas binários que apresentam o grau de assimetria em tamanho ou interação intermolecular.

2.2 Propriedades dos fluidos supercríticos

As propriedades físicas dos fluidos supercríticos estão entre os estados líquido e o gasoso. Os valores dessas propriedades para cada um dos estados de um fluido estão listados na Tabela 2. A densidade e a viscosidade do Fluido Supercrítico (FSC) é menor que a dos líquidos, no entanto, sua difusividade é maior. A condutividade térmica é relativamente mais alta no estado supercrítico e possui valores próximos ao ponto crítico (P_c), devido, em princípio a capacidade calorífica do fluido tender ao infinito no P_c . A tensão interfacial é próxima de zero na região crítica. Em geral as propriedades físicas na região crítica favorecem a transferência de calor e massa entre as fases do processo.

Tabela 2 – Comparação das propriedades físicas do gás, líquido e do fluido supercrítico.

Propriedade	Gás ($T_{ambiente}$)	FSC (T_c , P_c)	Líquido ($T_{ambiente}$)
Densidade ρ (kg/m^3)	0.6-2	200-500	600-1600
Viscosidade dinâmica μ ($mPa.s$)	0.01-0.3	0.01-0.03	0.2-3
Viscosidade cinemática η^1 ($10^6 m^2/s$)	5-500	0.2-0.1	0.1-5
Condutividade térmica λ (W/mK)	0.01-0.025	máximo ²	0.1-0.2
Coefficiente de difusão S ($10^6 m^2/s$)	10-40	0.07	0.0002-0.002
Tensão Superficial σ (dyn/cm^2)	-		20-40

¹ Viscosidade cinemática definida como $\eta = \mu/\rho$

² Condutividade térmica apresenta valor máximo próximo a região crítica, altamente dependente da temperatura.

Fonte: [Martinez \(2008\)](#)

2.2.1 Polaridade

A polaridade do CO_2 supercrítico é estimada pelo parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ). Este parâmetro, calculado

a partir da equação de Giddings, é função da pressão crítica e da densidade do fluido no estado supercrítico e no estado líquido (GIDDINGS et al., 1968b).

$$\delta = 1,25.P_c^{1/2} \cdot \frac{\rho_{fs}}{\rho_l} \quad (2.1)$$

onde: P_c é a pressão crítica do fluido, ρ_{fs} a densidade do fluido no estado supercrítico e ρ_l a densidade do líquido. A polaridade do CO₂ supercrítico situa-se entre a de um alcano e da piridina (Figura 2). Sua densidade no estado supercrítico pode variar entre 200 e 1000 kg/m³, mas na verdade, na maioria dos processos a densidade raramente fica abaixo de 600 a 700 kg/m³, de modo que seu parâmetro de solubilidade está entre o do pentano e do tolueno (solventes apolares ou pouco polares). Em condições normais de temperatura e pressão, o CO₂ é um líquido apolar ou pouco polar. Devido à sua baixa polaridade o CO₂ não é um "bom solvente" para as moléculas polares e/ou de alto peso molecular. A adição de uma substância chamada modificador polar ou co-solvente ou ainda "entrainer", permite modificar a solubilidade de compostos no CO₂ alterando o seu parâmetro de solubilidade. A Figura 2 mostra série eluotrópica de Giddings, com diferentes valores do parâmetro de solubilidade dos líquidos e fluidos supercríticos, (GIDDINGS et al., 1968b).

Medidas sistemáticas do poder solvente do dióxido de carbono mostraram que é um solvente extremamente apolar. Recentes medidas o colocaram entre os fluorocarbonos, menos polares que os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia curta, mesmo a altas densidades. Sendo assim a série eluotrópica de Giddings estava incorreta.

A série eluotrópica de Giddings foi comparada a uma escala empírica de poder solvente obtida utilizando um corante solvato-crômico 3. Tal corante muda sua coloração dependendo da força do solvente em contato. Os resultados obtidos com o corante confirmaram a inabilidade do CO₂ puro em eluir moléculas polares, devido a uma inadequada força solvente do dióxido de carbono (ANTON; BERGER, 1997).

2.2.2 Solubilidade

A extração supercrítica depende muito da solubilidade dos compostos de interesse no solvente em questão (fluido supercrítico). A implementação dos procedimentos de extração necessita, dessa forma, do conhecimento das regras gerais que regem a solubilidade de um soluto em um solvente supercrítico. O perfil de solubilidade do soluto no FSC evolui com a pressão e com a temperatura. Essa característica pode ser relacionada diretamente a estes parâmetros em termos de fugacidade, do parâmetro de solubilidade, dos coeficientes de Virial e da densidade do fluido. Esta abordagem desenvolvida por Chrastil correlaciona a solubilidade à densidade do fluido (CHRASIL, 1982), conforme a equação 2.2.

$$y^* = \rho^k \cdot \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad (2.2)$$

onde y^* é a concentração do soluto no fluido supercrítico, a , b e k as constantes empíricas.

Essa equação traduz bem que uma elevação da pressão, a uma temperatura constante, resulta em um aumento da densidade do fluido, que conduz a um aumento da solubilidade do soluto. Porém, o efeito da variação da temperatura, sobre a solubilidade fica mais complexo, onde é acompanhado de uma competição entre dois fenômenos. De fato, um aumento na temperatura, a pressão constante provoca uma redução na densidade e, portanto, reduz a solubilidade do soluto. Esse efeito é compensado por um aumento na pressão de vapor do soluto que leva a uma maior solubilidade no fluido. A influência relativa dos dois fenômenos é difícil de quantificar e depende muito da volatilidade e da natureza química do soluto. A equação proposta por Chrastil foi modificada por (ADACHI; LU, 1983) para correlacionar a solubilidade dos sólidos e líquidos em CO₂ supercrítico, equação 2.3, considerando que a constante k é um parâmetro dependente da densidade. Pois eles observaram que para muitos sistemas a relação proposta por Chrastil não era linear.

$$y^* = \rho^{(e_1 + e_2 \rho + e_3 \rho^2)} \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad (2.3)$$

2.2.3 O poder solvente do CO₂

Sabe-se que a solubilidade de uma substância depende da densidade do CO₂ supercrítico. Considerando que a temperatura e a pressão de trabalho influenciam nesta característica, pode-se assim afirmar que esses parâmetros influenciam na solubilidade dos compostos. A influência da temperatura e da pressão sobre a densidade do fluido supercrítico é ilustrada na Figura 4, (MCHUGH; KRUKONIS, 1986).

Em condições isotérmicas, um aumento na pressão provoca aumento da densidade, e portanto, um aumento do poder solvente. O aumento da solubilidade de um soluto só será eficaz acima da "pressão limite". Esta é definida como a pressão à qual o soluto começa a se dissolver no fluido supercrítico. Stahl e Quirin (1983) determinaram a pressão limite de diversos esteróides, conforme está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Pressão limite de esteróides com diversos substitutos

Substituição dos esteróides	Pressão limite (bar)
1 grupamento OH	80
2 grupamento OH	120
3 grupamento OH	150
4 grupamento OH	Não solúvel
1 grupamento carbonila	80
1 grupamento OH + 1 grupamento carbonila	90
1 grupamento OH + 1 grupamento fenol	100
2 grupamento OH + 1 ácido carboxílico	200
3 grupamento OH + 1 ácido carboxílico	Não solúvel

Fonte: Stahl e Quirin (1983)

A influência da temperatura sobre a solubilidade de uma substância em um solvente supercrítico é mais difícil de prever do que o da pressão. Em alta pressão, o fluido é dificilmente compressível e, portanto, a solubilidade aumenta com a temperatura, seguindo assim, o aumento da pressão de vapor do soluto. Porém, nas pressões intermediárias, próximas a pressão crítica, o fluido é altamente compressível e um pequeno aumento da temperatura provoca uma diminuição acentuada da densidade, que em para-

lelo reduz a solubilidade do composto no fluido supercrítico. A pressão a qual se efetua a mudança da influência da temperatura sobre a solubilidade do composto foi definida como a pressão de *crossover*, sobre ela, a solubilidade do composto é favorecida por um aumento na temperatura e, abaixo dela, o efeito inverso se produz. Na Figura 3 esta apresentada a evolução da solubilidade do naftaleno no etileno supercrítico a 12 e 35°C (STAHL; QUIRIN, 1983). O efeito da temperatura sobre a solubilidade de compostos em CO₂ supercrítico submetidos a pressões elevadas foi demonstrado por alguns autores. Como é o caso da vitamina K₁ e do β -caroteno, apresentadas nas Figuras 5 e 6, (PATTONAIK et al., 1997). Os dados experimentais de solubilidade da Vitamina K₁ (Figura 6) em fluido supercrítico nas temperaturas de (40, 60 e 80) °C e pressão de (200 a 350) bar, expressos em densidade na escala semi-logaritmica, mostram que a menor solubilidade foi encontrada a 80 °C e 200 bar (600 kg/m³) e a maior a 40 e 60 °C a pressão de 350 bar (860 kg/m³). Assim, dois efeitos são observados: Em uma temperatura constante a solubilidade aumenta com o aumento da densidade. Consequência do aumento do poder solvente do dióxido de carbono à alta densidade. À uma densidade constante (ex. 750 kg/m³), um aumento da temperatura resulta em um aumento da solubilidade. Isso ocorre devido a um aumento da pressão de vapor do sólido. Na Figura 5, a solubilidade do β -caroteno em CO₂ supercrítico a (40, 60 e 80) °C é mostrada como uma função da pressão. Nas isotermas, a solubilidade é maior a 80 do que (60 e 40) °C. Para todas as pressões investigadas a solubilidade aumenta com a temperatura. Primeiro, a força do poder solvente do CO₂ decresce devido a uma redução na densidade, segundo, a solubilidade aumenta devido ao aumento da pressão de vapor do β -caroteno. Neste caso, o efeito do aumento da pressão de vapor é dominante sobre o efeito da redução do poder solvente quando a temperatura aumenta, (PATTONAIK et al., 1997). Nas faixas de pressão investigadas a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura, embora ao mesmo tempo ocorra a redução da densidade. Para o β -caroteno o aumento da sua pressão de vapor exerce uma influência maior do que a densidade do CO₂. Um comportamento

contrastante daquele encontrado na Vitamina K_1 .

2.2.4 Solubilidade de compostos dos óleos essenciais

O conhecimento da solubilidade dos compostos a serem extraídos e dos compostos indesejáveis que são extraídos ao mesmo tempo, é uma informação fundamental em um processo de extração com FSC. Os dados sobre a solubilidade permitem selecionar o intervalo de pressão e de temperatura de extração e as condições de separação, especialmente quando uma separação de multi-estágio está prevista.

Os dados de solubilidade podem ser obtidos experimentalmente (método dinâmico ou estático) ou ainda a partir das equações de estado. Encontra-se na literatura muitos dados de solubilidade relativa de compostos presentes no óleo essencial, mas poucos dados sobre as misturas de compostos do óleo essencial (DI-GIACOMO et al., 1989; MATOS et al., 1989; BRANDANI et al., 1990; RICHTER; SOVOVÁ, 1993; MARTEAU; OBRIOT; TUFEU, 1995; GASPAR et al., 2003). Gaspar et al. (2003) determinaram a solubilidade dos óleos essenciais de Boragem, Echium e Lunaria, pelo método dinâmico, e seus resultados mostraram que para uma dada temperatura, a solubilidade aumentava com o aumento da pressão, mas para baixas pressões (60 e 100) bar, um aumento na temperatura conduzia a uma redução na solubilidade. Esse fenômeno inverso ocorreu em pressões elevadas de 300 bar. Uma relação linear entre o logaritmo da solubilidade e o logaritmo da densidade do solvente foi encontrada utilizando a equação de Chrastil.

Sovová (2000) avaliou a solubilidade de alguns monoterpenos (α -pineno, limoneno, mentol, cis-verbenol) e de triglicerídeos (ácido ferúlico, β -caroteno). Os resultados mostraram que esses triglicerídeos apresentavam uma linearidade utilizando a equação de Chrastil contra os demais que é melhor correlacionado pela equação de Adachi.

Danielski et al. (2007) determinaram a solubilidade de Calêndula pelo método dinâmico, o fenômeno de *crossover* foi ob-

servado na vizinhança de 140 bar, para as isotermas de (20 e 40) °C. Os resultados experimentais obtiveram boas correlações com a equação de Chrastil, salvo ao ponto de *crossover*, onde um erro de 22% foi obtido, isto se deve ao fato de que a equação de Chrastil depende unicamente da densidade do solvente.

Os dados de solubilidade podem ser utilizados diretamente para avaliar a possibilidade de extração de solutos, mas somente em caso onde o soluto não apresenta nenhuma afinidade com a matriz sólida, exemplo dos óleos vegetais. Se o soluto a ser extraído está adsorvido ou contido em uma matriz sólida de estrutura complexa, a exemplo dos óleos essenciais, outras relações de equilíbrio devem ser aplicadas. Portanto nos casos de uma dessorção a partir de uma matriz sólida, as isotermas de dessorção são necessárias para avaliar a concentração relativa na fase sólida e na fase fluida. Quando o soluto está localizado no interior de uma matriz sólida vegetal complexa o equilíbrio de fases está estabelecido entre as duas fases (BENSEBIA et al., 2009).

Estudos mostraram que a solubilidade de compostos chave, puros, são muito maiores comparado ao extrato do óleo essencial obtidos por extração. Ou seja, a determinação da solubilidade de compostos, determinada isoladamente, é muito maior do que quando comparada à solubilidade do extrato no qual está contido. Este resultado confirma a existência de um coeficiente de partição entre as duas fases em contato, (REVERCHON, 1992; GOTO; SATO; HIROSE, 1993).

Akgün, Akgün e Dincer (1999) avaliaram o equilíbrio de fases vapor-líquido para o α -pineno, limoneno e a fenchona, assim como o comportamento de solubilidade da cânfora em FSC, como uma função da pressão e temperatura, utilizando o método estático. Gupta e Shim (2007) correlacionaram esses dados e demonstraram o comportamento da solubilidade do α -pineno para as pressões de (73 a 110) bar, nas temperaturas de (40, 50 e 60) °C. Na Figura 7, adaptada por Gupta e Shim (2007), é possível notar que para a faixa de pressão de (80 a 100) bar, quanto menor a temperatura, entre (50 e 60) °C, maior a solubilidade do α -pineno em CO₂ supercrítico. Ainda, para as pressões abaixo de 80 bar, o efeito temperatura se confunde, onde aparentemente

sendo maior a temperatura, maior a solubilidade, porém faltam dados a 50 °C para verificar essa hipótese.

Para o limoneno, Figura 8, também é possível notar que com o aumento da pressão ocorre um aumento na solubilidade. Em pressões acima de 80 *bar* observa-se que quanto menor a temperatura maior a solubilidade em CO₂ supercrítico. Porém, para as pressões abaixo de 80 *bar* o efeito da influência da temperatura não é notado, sendo os valores muito próximos, para a escala utilizada. Benvenuti (2001) demonstrou a solubilidade do limoneno a 42 °C na faixa de pressão de 30 *bar* a 85 *bar*, onde um aumento expressivo ocorre após o ponto de pressão crítica do CO₂, (BENVENUTI; GIRONI, 2001).

Para a cânfora efeito similar ocorre no comportamento de sua solubilidade em CO₂ supercrítico, (AKGÜN; AKGÜN; DINCER, 1999). Para as pressões acima de 80 *bar* nota-se o efeito da temperatura sob uma mesma pressão, onde a menor temperatura está associada a uma maior solubilidade. É interessante observarmos que para a faixa de pressão de 80 *bar* a 100 *bar* uma maior diferença aparece na solubilidade da cânfora entre (40, 50 e 60) °C, após os 100 *bar* até aproximadamente 115 *bar* a solubilidade a 50 °C se aproxima a de 40 °C, Figura 9. Conforme ocorre o aumento da pressão a partir de 120 *bar*, a solubilidade a (40, 50 e 60) °C se aproximam entre si.

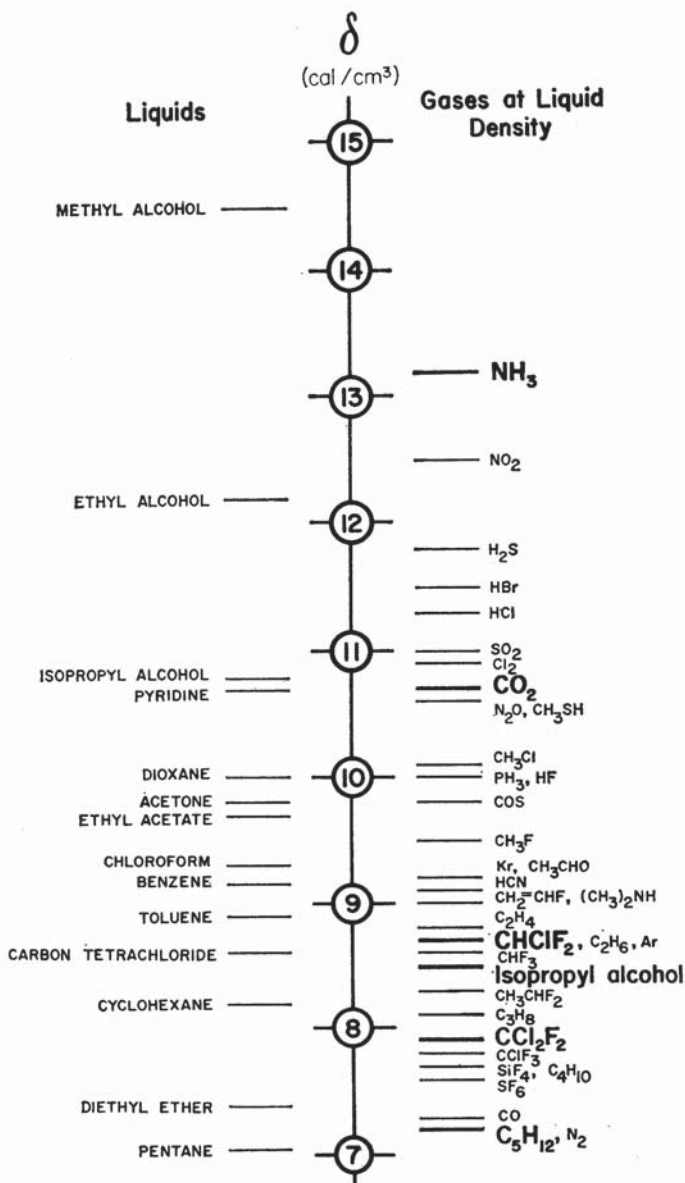
A solubilidade do 1,8 cineol (cineol ou eucaliptol) foi determinada por Francisco *et al.* (2002), onde observa-se que a maior solubilidade está associada a menor temperatura na mesma pressão, Figura 10, para a faixa de (60 a 250) *bar*, (FRANCISCO; SIVIK, 2002).

A partir desses dados de solubilidade para os compostos, α -pineno, 1,8 cineol (eucaliptol), limoneno e cânfora, observa-se que, dentro de uma faixa de pressão, geralmente compreendida entre (80 e 120) *bar* a solubilidade tem um relação direta com a densidade do CO₂. Isso é evidente quando o efeito da pressão de vapor dos compostos não predomina. Na Figura 11 está demonstrado o comportamento da densidade do CO₂ para as temperaturas de (40, 50 e 60) °C.

Os diferentes estudos realizados sobre a solubilidade dos

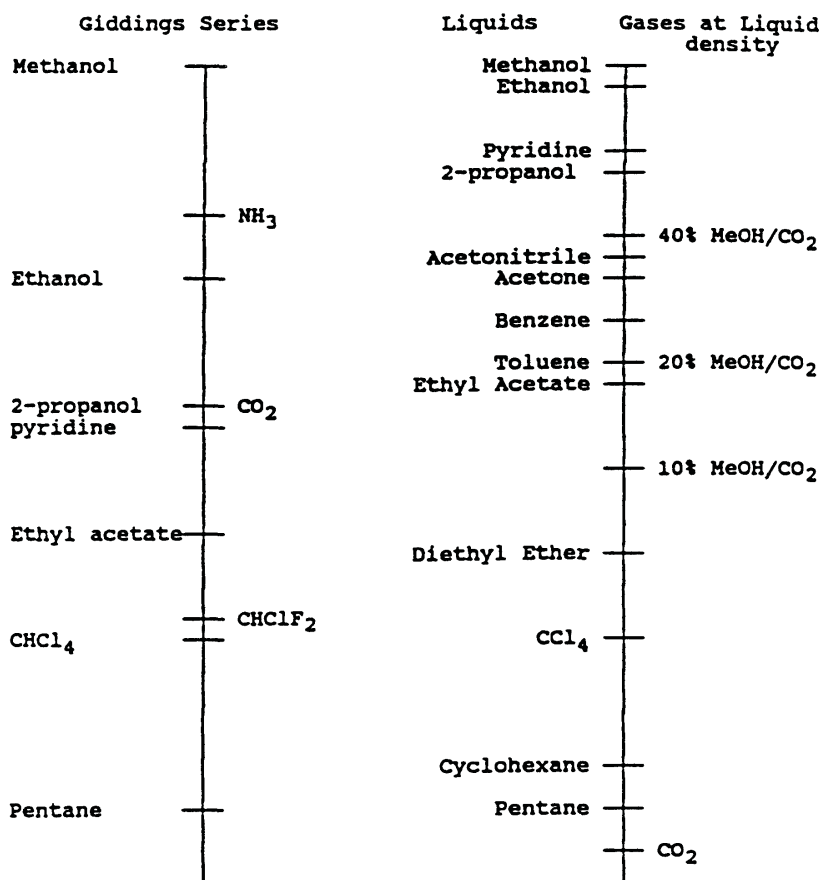
diferentes compostos extraídos das matrizes vegetais mostraram que para baixas densidades do CO_2 os produtos terpênicos são mais solúveis que os produtos parafínicos e ácidos graxos. Para densidades elevadas os produtos terpênicos e oxigenados são completamente miscíveis no CO_2 supercrítico.

Figura 2 – Parâmetros de solubilidade de diferentes líquidos e fluidos supercríticos na série eluotrópica de Giddings.



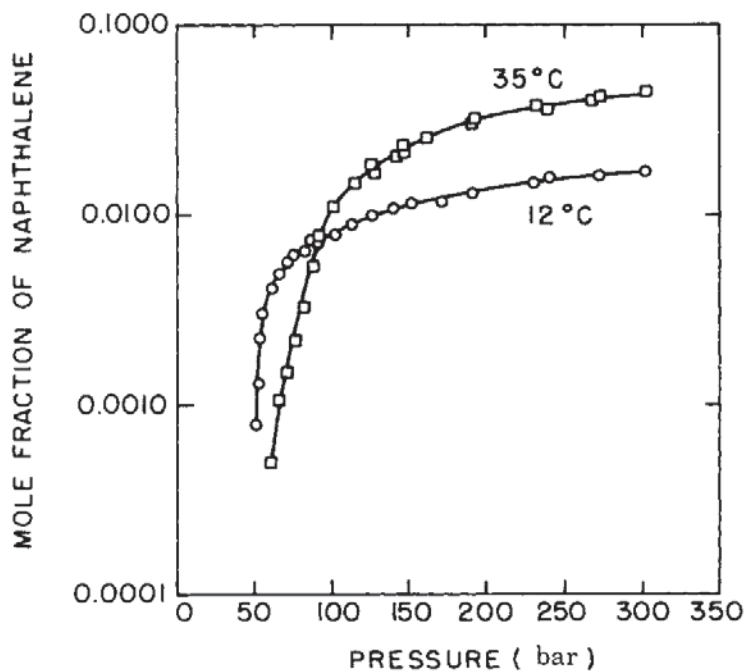
Fonte: Giddings et al. (1968a)

Figura 3 – Comparação da série eluotrópica de Giddings (1968), esquerda, com a recente escala empírica da força de solvente (BERGER; SMITH, 1995), baseada no corante solvatocrômico vermelho nilo. Giddings avaliou o dióxido de carbono como sendo próximo ao isopropanol quanto a sua força solvente, e baseado no corante solvatocrômico a sua força é próxima à do pentano. Fonte: Adaptado de Anton (1997).



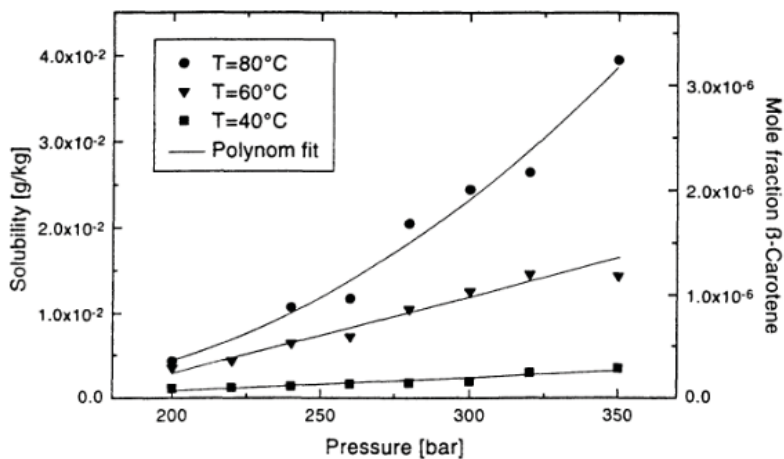
Fonte: Adaptado de Anton e Berger (1997)

Figura 4 – Solubilidade (em fração molar) do naftaleno em etileno supercrítico em função da pressão, à 12 °C e 35 °C. (T_c etileno = 9,3 °C).



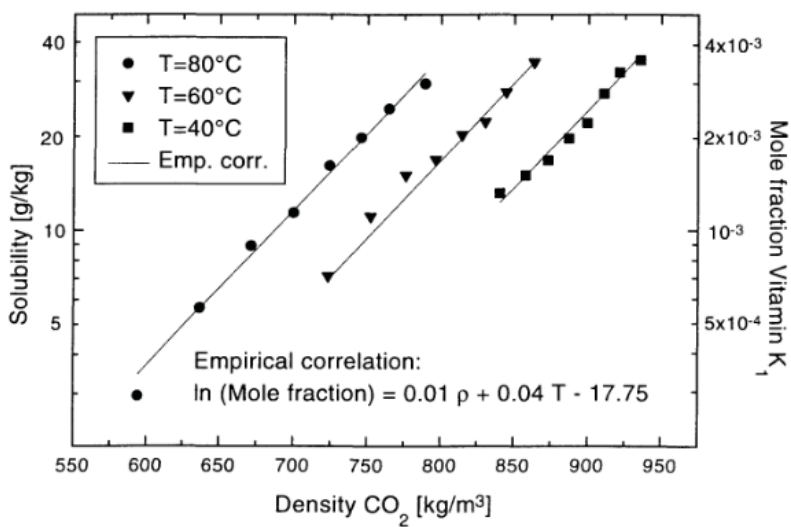
Fonte: McHugh e Krukonis (1986)

Figura 5 – Solubilidade do beta-caroteno em CO_2 supercrítico como função da densidade a diferentes temperaturas.



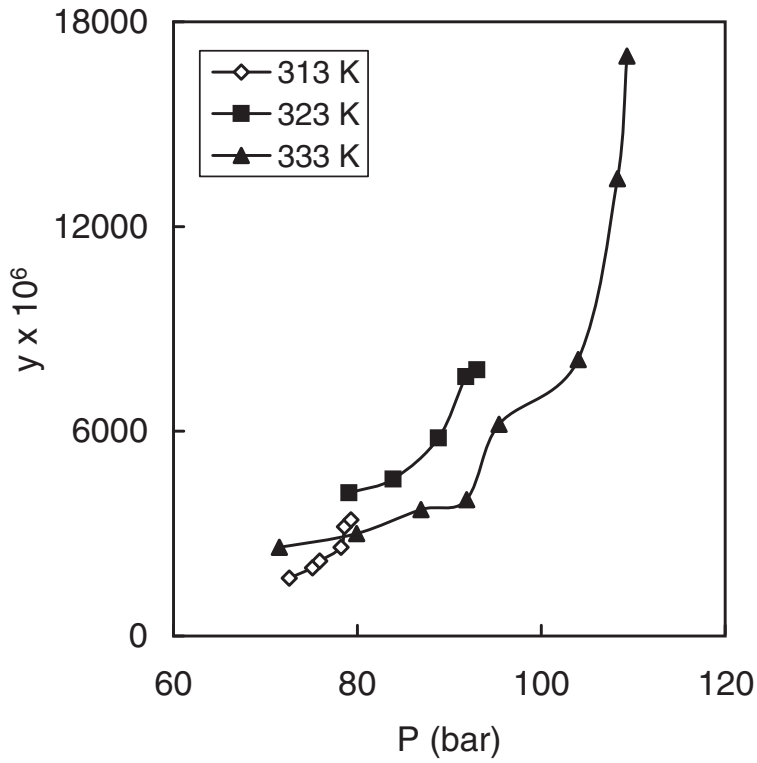
Fonte: [Pattnaik et al. \(1997\)](#)

Figura 6 – Solubilidade da vitamina K_1 em CO_2 supercrítico como função da densidade a diferentes temperaturas.



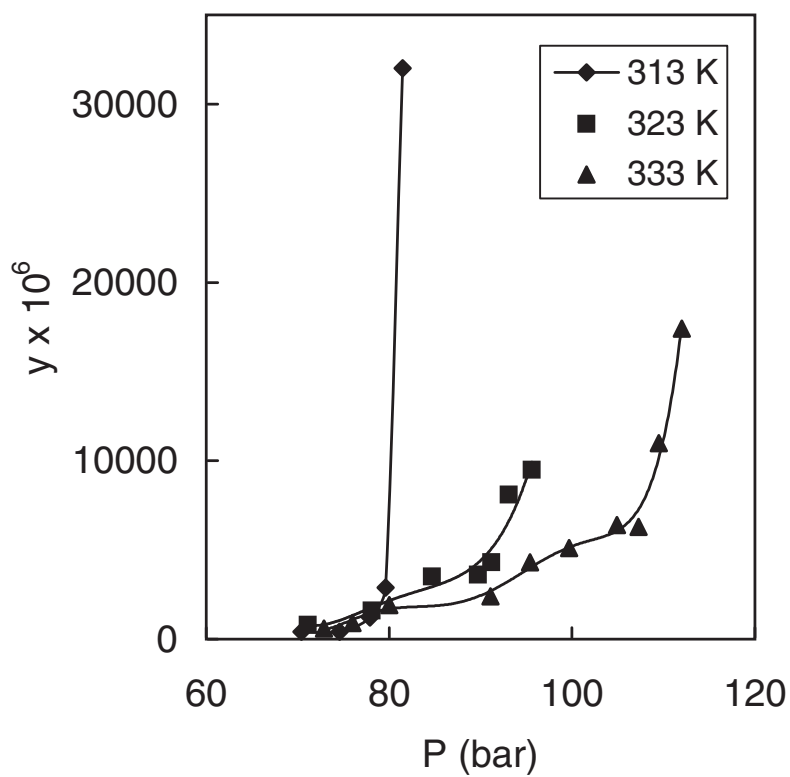
Fonte: [Pattnaik et al. \(1997\)](#)

Figura 7 – Solubilidade do α -pineno em CO_2 supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.



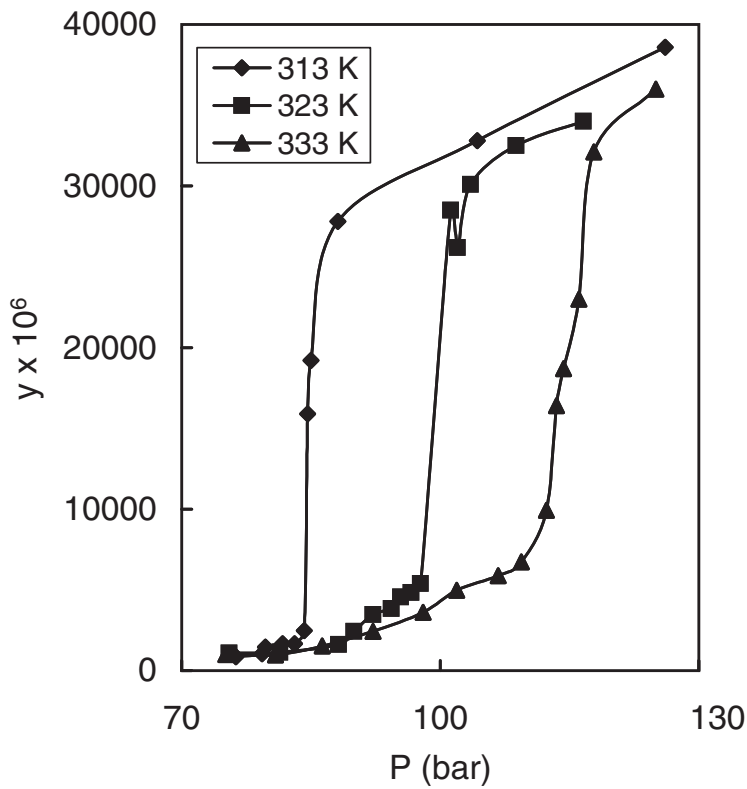
Fonte: [Gupta e Shim \(2007\)](#)

Figura 8 – Solubilidade do limoneno em CO₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.



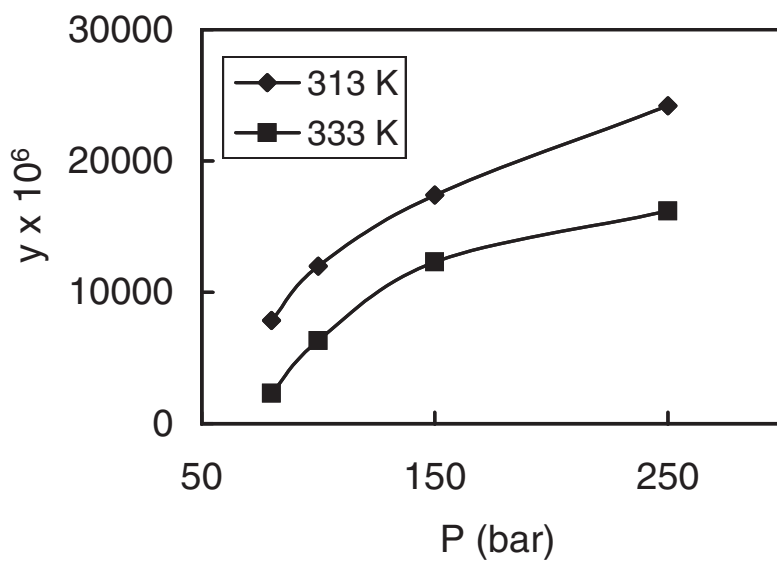
Fonte: Gupta e Shim (2007)

Figura 9 – Solubilidade da cânfora em CO₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.



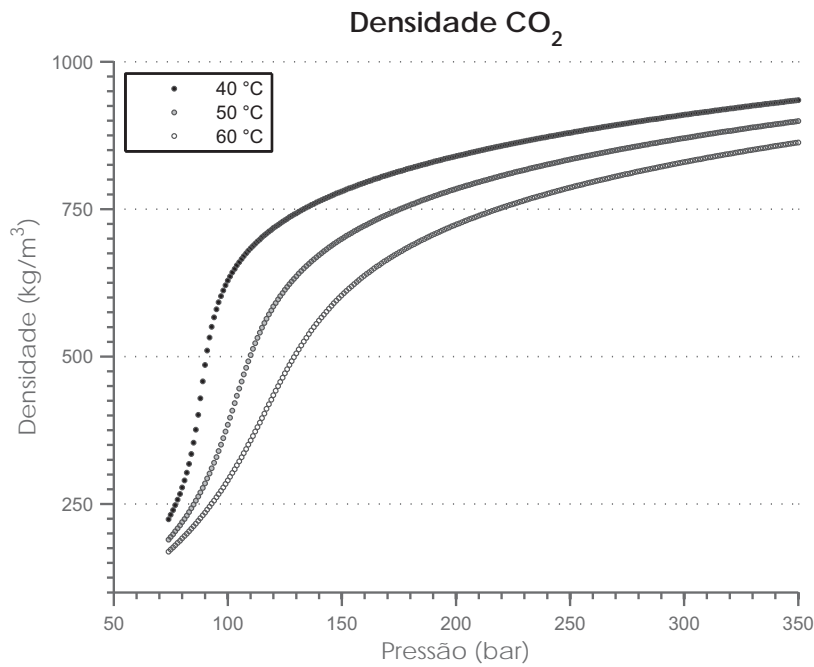
Fonte: Gupta e Shim (2007)

Figura 10 – Solubilidade do 1,8 cineol (eucaliptol) em CO₂ supercrítico como função da pressão a diferentes temperaturas.



Fonte: [Gupta e Shim \(2007\)](#)

Figura 11 – Densidade do CO₂ para as temperaturas de (40, 50 e 60) °C.



2.3 Extração com fluido supercrítico

A extração com fluido supercrítico consiste em um processo de duas etapas: extração e separação dos componentes solúveis no solvente SC. A extração pode ser aplicada a sólidos, líquido ou uma matriz viscosa. Baseado no objetivo de extração, dois diferentes cenários podem ser considerados

1. Separação do material impregnado. Neste caso, a matéria-prima constitui o produto final, após os compostos indesejáveis serem removidos, por exemplo, desalcoolização de bebidas alcoólicas, a remoção de off-flavors ou descafeinação do café (ZOSEL, 1974).
2. Separação do extrato do material. Os compostos extraídos da matéria-prima constituem o produto final, por exemplo, óleo essencial ou extração de antioxidantes.

A separação dos compostos solúveis no fluido supercrítico pode ser realizada por meio da modificação das propriedades termodinâmicas do solvente supercrítico ou por um agente externo. No primeiro caso, o poder solvente é modificado manipulando-se a pressão ou temperatura. No segundo caso, a separação pode ser realizada por adsorção ou absorção. O método mais comum diminui a pressão pela expansão isoentálpica, que provê uma redução da densidade do fluido e, portanto, uma redução do seu poder solvente. Se a separação acontecer com a manipulação da temperatura, duas situações podem ocorrer, dependendo da solubilidade dos compostos dissolvidos. Se a solubilidade aumenta com a temperatura a pressão constante, a diminuição da temperatura diminui a solubilidade e separa os compostos dissolvidos no solvente supercrítico. Se a solubilidade diminui com o aumento da temperatura a pressão constante, um aumento na temperatura irá separar os componentes do fluido supercrítico solvente. Se a separação é realizada por um agente auxiliar, como um adsorvente, sem ocorrer alteração significativa da pressão, o diferencial de pressão entre a bomba é muito menor. Este tipo de processo implica em custos operacionais mais baixos. No entanto, a recuperação do extrato do adsorvente é frequentemente

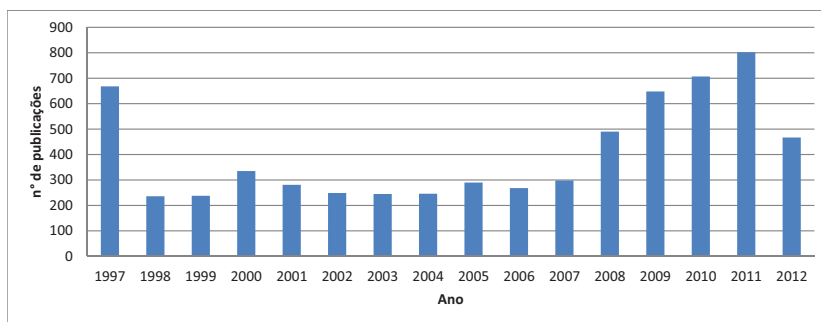
muito difícil. Para superar esta desvantagem de perdas elevadas do extrato, a etapa de adsorção pode ser substituída por uma etapa de absorção. O extrato dissolvido no solvente supercrítico é absorvido por um fluido de lavagem em um fluxo de contracorrente com uma coluna empacotada ou torre spray sob pressão. A separação de solutos por adsorção e absorção tem sido aplicada na descafeinação de café (ZOSEL, 1974).

Uma das principais vantagens dos fluidos supercríticos é a capacidade de modificar sua seletividade por meio da variação da pressão e da temperatura (isto é, modificando densidade do fluido). Portanto, fluidos supercríticos são usados para extrair seletivamente ou separar um composto específico de uma mistura. Um desses procedimentos se dá pelo processo de extração fracionada. Neste caso, a extração é realizada em duas etapas. Durante a primeira fase, é selecionada uma relativa baixa densidade do fluido, o que permite a extração dos compostos que são solúveis em baixa pressão. Em seguida, o resíduo é extraído com uma maior densidade do fluido para recuperar os compostos mais pesados (por exemplo, desalcoholização da sidra, (MEDINA; MARTINEZ, 1997)). Outro exemplo de extração fracionada consiste na remoção das frações apolares na primeira fase, com um solvente supercrítico e a remoção de uma fração mais polar do resíduo presente na segunda fase. Pode-se citar como exemplo, a extração de ingredientes ativos a partir de semente de uva, com adição de um co-solvente (MARTINEZ; ASHRAF-KHORASSANI; CHORDIA, 2003).

Embora a extração com fluidos supercríticos tenha iniciado a mais de 50 anos, o número de publicações envolvendo esse título tem aumentado ano após ano. Segundo dados obtidos em um portal de publicações (sciencedirect.com) o crescimento dessa área se manteve constante nos últimos cinco anos, conforme pode-se observar na Figura 12. Isso demonstra a importância do contínuo desenvolvimento desse campo de pesquisa.

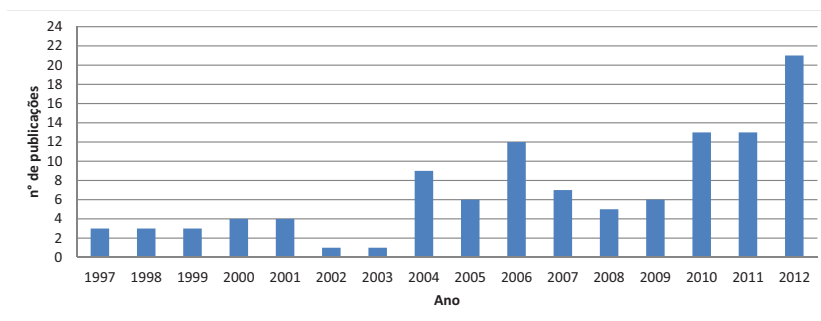
Ainda, no mesmo portal de publicações (sciencedirect.com) pesquisas envolvendo a extração supercrítica de alecrim tem aumentado nos últimos 3 anos, Figura 13, mostrando novas abordagens na pesquisa dessa planta.

Figura 12 – Número de publicações com o título (Supercritical Fluid Extraction), pesquisado em 06-2012.



Fonte: ScienceDirect.com

Figura 13 – Número de publicações com o título (Supercritical Fluid Extraction 'e' *rosmarinus officinalis*), pesquisado em 06-2012.



Fonte: ScienceDirect.com

García-Risco et al. (2010) avaliaram o efeito da ampliação na escala de extração supercrítica do alecrim (0,6 kg de matriz vegetal) a 300 bar e 40 °C, comparando com os dados da literatura em escala analítica (0,03 - 0,1 kg). Para isso foi mantida a relação de vazão de CO₂, proposta por Carvalho et al. (2005). Eles observaram que o comportamento cinético na curva de extração se manteve, porém um pouco atrasada em relação à escala analítica. Atribuiu esse fato ao tamanho de partícula utilizado da matriz vegetal, que em seu trabalho era maior (500-1000 μm) daquele em escala inferior (660 μm).

Bensebia et al. (2009) analisaram os efeitos dos parâmetros de extração supercrítica de alecrim, tamanho médio de partícula (150 - 436 μm), vazão de solvente (1-5 g/min), pressão (100-180 bar), temperatura (40-60 °C) e adição de etanol (3 %) na matriz vegetal. Concluiu que os parâmetros, tamanho de partícula, pressão e temperatura afetam a taxa de extração, onde a vazão de solvente apresentou uma influência desprezível na cinética de extração.

Ivanovic et al. (2009) isolou e caracterizou extratos de alecrim, obtidos a 300 bar a 40 °C e 100 °C. Determinaram que a fração com maior potencial antioxidante foi obtida nas condições de 300 bar a 100 °C, evidenciando a sua maior atividade antioxidante comparado ao antioxidante sintético (BHA) e ao extrato de alecrim comercial (FlavorPlusTM).

Pereira e Meireles (2007) realizaram uma avaliação econômica do processo de extração supercrítica de alecrim, erva-doce e funcho, comparando o custo de manufatura desses processos com o hidrodestilado. As análises demonstraram a viabilidade econômica da obtenção do extrato por extração supercrítica. Onde os altos custos de obtenção do óleo essencial obtido por hidrodestilação está associado principalmente ao baixo rendimento e ao alto consumo energético desse processo.

Peng et al. (2007) obtiveram o extrato supercrítico do alecrim a partir de folhas frescas, nas condições de 340 bar e 80 °C (10 % co-solvente etanol), com um rendimento de 5,3 %, onde cinco compostos majoritários foram identificados por LC/MS, dentre eles o ácido rosmarínico e o ácido carnósico estavam pre-

sentes. O extrato foi testado frente a células tumorais (TNF- α), indicando que seu potencial anti-tumorigênico e nas dosagens de aplicação entre 3,13 a 25 $\mu\text{g/mL}$ não citotóxica. Concluíram que o alecrim pode ser considerado uma erva anti-inflamatória e anti-tumoral.

Os trabalhos aqui reportados são alguns exemplos dos abundantes estudos na literatura sobre a ESC de alecrim.

2.4 Separação e purificação de compostos naturais

A separação de compostos naturais é amplamente estudada (YANAGIDA et al., 2007; DALTON; BRANT; WIESNER, 2005; FISCHER et al., 1991; YANG et al., ; IGNAT; VOLF; POPA, 2011; BIELSKI; TENCER, 2010; SETIANTO et al., 2009; SARRADE; RIOS; CARLÈS, 1998; LU; WEI; YUAN, 2007; ACKLEY; REGE; SAXENA, 2003; FANG et al., 2007; MARSTON; BOREL; HOSTETTMANN, 1988), e realizada por diferentes métodos. Os processos mais conhecidos são, *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), *Supercritical Fluid Chromatography* (SFC), destilação, centrifugação e filtração.

Os processos de separação de compostos são guiados por fatores econômicos, em se tratando de produção, onde cada caso é avaliado individualmente quanto a escolha do seu modelo de processo. Dentre as técnicas de separação, amplamente conhecidas como o HPLC, SFC ou *Simulated Moving-Bed* (SMB), diferentes casos podem ser aplicados a cada uma delas, que basicamente envolvem o modo de operação (batelada ou contínuo) e a escala (analítica, semi-preparativa, preparativa ou industrial). A escolha desses processos se resume nas características do composto a ser separado, pureza final e escala, aliada aos fatores econômicos. Cada tipo de processo apresenta suas vantagens e desvantagens.

Atualmente o uso de técnicas de cromatografia preparativa para produção de substâncias de alta pureza é bem estabelecido. Além dos clássicos processos descontínuos de eluição em batelada, diferentes conceitos para separação cromatográfica têm sido desenvolvidos. Um importante desenvolvimento nessa área é, por exemplo, o processo contínuo de leito móvel simulado, SMB (PEPER; JOHANNSEN; BRUNNER, 2007).

Na cromatografia em batelada a mistura de alimentação é injetada em modo descontínuo, como um pulso na corrente de solvente na entrada da coluna (HPLC-batelada). O solvente (fase móvel) carrega a mistura de componentes através do leito adsorvente (fase estacionária). Devido a diferentes afinidades de adsorção dos componentes da alimentação, as velocidades de eluição dos componentes são diferentes. Se a distância entre os

componentes é suficientemente grande na saída da coluna, os componentes individuais podem ser recolhidos em recipientes diferentes.

Toda a base para desenvolvimento de um processo de separação de misturas complexas passa pela cromatografia. A partir dessa técnica pode-se fazer estimativas do potencial econômico e viabilidade de obtenção de um determinado produto. Na indústria, para separação em larga escala, essa técnica é utilizada como primeiro passo na avaliação de um processo de separação. Seja ele na determinação analítica para validação do método, como análise quantitativa, seja ele para ensaios em escala piloto para agregação de valor em produtos farmacêuticos. Com o constante desenvolvimento de novas técnicas separativas hoje potencializadas pela busca de produtos de fontes naturais, e não mais impulsionadas pela busca de rotas de síntese (na área de produtos naturais), volta-se a atenção sobre tais técnicas. O SMB veio com o intuito de suprimir os custos operacionais das técnicas de separação cromatográfica realizadas em batelada.

O processo de separação cromatográfica em escala industrial tem objetivos diferentes da escala analítica. Segundo Pynnonem (1998) um processo cromatográfico possui muitos graus de liberdade quando da sua escolha no planejamento do processo de separação. Fatores que não são importantes em escala analítica são de extrema importância no custo do processo de separação em escala industrial, tais como, alta solubilidade do soluto no eluente, tamanho da coluna, temperatura de operação, trabalho de empacotamento da coluna, tamanho de partículas, recuperação do solvente e escala do equipamento. O uso de tamanhos de partículas na faixa de (50-200) μm , considerado grande, quando comparado as de escala analítica (5 μm), empacotado em colunas maiores e operando em modo contínuo, em sistema SMB, pode reduzir o custo do processo de separação em ordens de magnitude. Ainda segundo o autor, a visão analítica de um processo de separação o qual visa se obter picos bem definidos com alta pureza e resolução não se aplicam a um modelo econômico do processo industrial. Sendo a chave para se libertar de um alto custo é a mudança na maneira de se planejar o processo. Nos

processos de cromatografia por eluição (processos normais em batelada, como em HPLC-analítico) a alta pureza de um composto e sua recuperação não pode ser obtida com baixa resolução de pico. Porém em um processo contínuo, como no caso do SMB isso seria possível, e se tornou uma realidade há algum tempo, (PYNNONEN, 1998).

Para uma avaliação global do custos de um processo de separação, quatro são os fatores de maior influência. São eles, a coluna de separação e suas condições operacionais, o tamanho de partícula utilizado, a escala e a otimização econômica do processo. Sendo importantes tanto em um sistema de eluição (cromatografia líquida em batelada) como em um sistema SMB. Se apenas um desses fatores é otimizado é improvável que o custo seja minimizado. Para apresentar um visão mais geral do impacto de suas escolhas serão descritas, brevemente, as principais característica de cada um deles.

- Tamanho de partícula
 - Perda de carga
 - Custo do equipamento
 - Resolução
 - Procedimento de empacotamento da coluna
- Coluna de separação e condições operacionais
 - Dimensões da coluna (altura e diâmetro)
 - Vazão de solvente
 - Alimentação (pureza e concentração)
 - Distribuição (sistema de coleta das frações)
- Economias de escala
 - Investimento (equipamentos)
 - Custo operacional
- Otimização econômica
 - Integração do processo

Compra de solventes *vs* reciclo

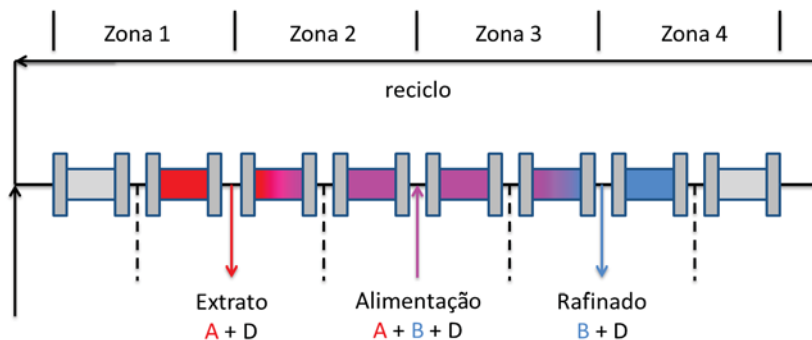
2.4.1 Leito Móvel Simulado (SMB)

A separação de compostos vem sendo desenvolvida por décadas, e o uso de processos cromatográficos se deu desde 1950, quando em 1960 sofreu um grande salto no seu desenvolvimento, quando a empresa UOP (Process Division, EUA) introduziu no mercado um novo processo chamado de, leito móvel simulado, **SMB**, o *Sorber*.

Um sistema SMB consiste em várias colunas ligadas umas às outras em um circuito. Um fluxo contra-corrente entre a fase estacionária e móvel é simulado por comutação das portas de entrada e saída das colunas periodicamente na direção do fluxo de fluido. Os quatro fluxos externos (alimentação, extrato, refinado e o dessorvente ou eluente) dividem o sistema em quatro seções ou zonas com diferentes vazões de fase móvel. A separação é realizada nas zonas 2 e 3, onde o componente mais retido tem de ser adsorvido e levado para a porta de extrato por meio do movimento simulado da fase estacionária, enquanto que o composto menos adsorvido sendo transportado na direção oposta com a fase móvel para a porta do refinado. A zona 1 da fase sólida (estacionária) e a zona 4 da fase móvel são limpas. Se todas as vazões e as aberturas das válvulas de admissão e de saída são determinadas corretamente, as frações do refinado e do extrato podem ser retiradas com purezas elevadas. Em um processo SMB com mais de quatro colunas, as posições relativas dos quatro fluxos não são únicas. Isto cria um grande número de configurações possíveis de coluna, em cada uma das zonas, Figura 14 (NAVARRO et al., 1997; MATA; RODRIGUES, 2001; KAISER et al., 2009; JO; NAM; MUN, 2010).

Kaemmerer, Brunner e Johannsen (2007) desenvolveram um ciclo de solvente com a possibilidade de controle do modificador em uma unidade SMB-SFC-preparativo. A aplicabilidade do conceito do controle desenvolvido para utilização de 2-propanol em CO₂ supercrítico foi verificada por uma série de testes experimentais envolvendo uma planta SMB-SFC de oito colunas.

Figura 14 – Esquema funcional de um processo contínuo SMB.



Diferentes variações no processo foram avaliadas em termos de consumo energético e de solvente. Obtiveram uma economia e recuperação de quase todo o CO_2 e 76 % do modificador utilizado.

Segundo [Peper, Johannsen e Brunner \(2007\)](#), com os resultados obtidos em seu trabalho de comparação do custo de separação do $R - /S$ -Ibuprofen utilizando fluidos supercríticos, ele encontrou diferenças significantes entre as técnicas de HPLC-batelada, SFC-batelada e SMB-SFC (utilizando CO_2 como fase móvel). Em escala analítica (baixas vazões), ele observou que o processo de separação utilizando SMB-SFC é muito mais caro do que os processos em batelada, tanto em HPLC ou SFC. Em escala de produção o custo de separação utilizando o HPLC é dominado pelos custos da fase estacionária e móvel (solventes e sua recuperação) ([JUPKE; EPPING; SCHMIDT-TRAUB, 2002](#)). Do contrário na SFC, até 80 % dos custos são em investimentos, e a fase móvel, no caso CO_2 , é relativamente barata e facilmente recuperada por completo, no reciclo. Ainda segundo [Peper, Johannsen e Brunner \(2007\)](#) o SMB é mais econômico se líquidos forem utilizados como fase móvel, caso contrário a SFC-batelada se torna mais vantajosa.

2.4.2 Cromatografia Supercrítica

Os fluidos supercríticos possuem densidades e capacidades de dissolver, muito semelhantes à de certos líquidos, porém com menor viscosidade e melhores propriedades de difusão. Assim, os FSCs utilizados como fase móvel em cromatografia atuam como transportadores de substâncias, assim como a fase móvel em cromatografia gasosa (GC), e também para dissolver estas substâncias como solventes em cromatografia líquida (HPLC). Esta variação é conhecida como cromatografia supercrítica (SFC). Klesper *et al.* (1962) são considerados descobridores da SFC, eles descreveram, em 1962, a separação de derivados parfirínicos termolábeis com clorofluorometanos supercrítico em pressões de até 140 bar e temperaturas entre 150 e 170 °C, (KLESPEL; CORWIN; TURNER, 1962). Este método foi desenvolvido tanto na teoria e experimentalmente mais tarde por outros autores na mesma década (SIE; RIJNDERS, 1967). Mais de 300 artigos foram publicados no período de dois anos terminando em novembro de 2005. Trabalhos de aplicação compoem a maioria dos trabalhos publicados. Aplicações farmacêuticas envolvendo compostos moderadamente polares foram temas na área de SFC. Alimentos e produtos naturais, juntamente com aplicações ambientais foram o principal foco principal da SFE. A maior parte dos trabalhos na área ambiental tratavam-se de compostos apolares como os hidrocarbonetos poliaromáticos e bifenilos policlorados em que o CO₂ supercrítico (apolar) rendeu elevada eficiência de extração. Sistemas com co-solvente combinado com CO₂, com um ou mais modificadores aumentaram a utilidade do CO₂ supercrítico para os analitos mais polares foram utilizados para resolver problemas de separação de produtos farmacêuticos. Dessa forma, novas razões foram redescobertos que favoreceram o uso da SFC com o um aumento da demanda por processos ambientalmente corretos visando a eliminação de solventes orgânicos que levam à destruição da camada de ozônio (TAYLOR, 2010).

2.4.2.1 Cromatografia Supercrítica com coluna empacotada (pSFC)

A pSFC com recheio têm sido amplamente aceita. É mais robusta e mais adaptável a um amplo espectro de classes de compostos, além dos compostos poliméricos de baixo peso molecular e de surfactantes não iônicos (SIE; RIJNDERS, 1967). Dessa forma, é mais útil para as rotinas de separação de produtos farmacêuticos, do que, por exemplo, colunas capilares (colunas abertas) para SFC. É seguro dizer que a SFC está sendo aprimorada e mais utilizado na indústria (TAYLOR, 2009), onde o campo de aplicação está tecnologicamente mais aprimorado (FRUTOS; HER-NANDEZHERRERO, 2005). As razões, embora re-descobertas favorecem o uso do SFC, tais como um aumento da procura por processos ambientalmente corretos com a eliminação de solventes orgânicos (REIS-VASCO; COELHO; PALAVRA, 1999). Além disso, a união de pSFC à espectrometria de massas e detectores de UV é experimentalmente mais simples do que a utilização de colunas capilares (abertas) em SFC. Sabe-se que a SFC é uma cromatografia em fase normal, porém sem a maioria dos problemas, geralmente associada à fase normal do HPLC.

Nos procedimentos de análise, para atingir o ponto de equilíbrio em um SFC é muito rápido, pois geralmente necessitam de um vazão de somente 60 % do volume da coluna. A composição, pressão e a temperatura podem ser programadas, com rápida recuperação das condições iniciais entre as análises. Resíduos ou traços de água não causam variações na retenção de compostos, o que frequentemente acontece em cromatografia HPLC de fase normal. Segundo Mukhopadhy (2008) os trabalhos que foram publicados durante a década passada continuam em uma tendência perturbadora na medida em que o desenvolvimento fundamental do SFC se torna um foco para muitas aplicações. Especificamente, muitos dos manuscritos são aplicações orientadas para ou de autoria de organizações (clientes), como empresas farmacêuticas. Essas empresas e os seus autores devem ser recomendados a pesquisar e compartilhar livremente tais importantes trabalhos. No entanto, a ausência geral de trabalhos fundamentais de SFC relacionados à comunidade acadêmica, preocupa, do ponto de

vista dos avanços e das aplicações na ciência e na formação de estudantes e futuros pesquisadores na área. Em grande parte, pesquisadores na área ainda estão relutantes em trocar, do sistema HPLC para o SFC, devido ao tempo necessário a ser investido no desenvolvimento de novas metodologias, que hoje já são dominadas pelas técnicas clássicas (Corrêa Júnior; MING; SCHEFFER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2008).

Informações apresentam inúmeras vantagens de se trabalhar com pSFC em relação ao HPLC: (a) menor viscosidade e maior difusividade da fase móvel supercrítica em relação aos líquidos que levam à separações mais rápidas e eficientes por unidade de tempo, e menor tempo de recuperação entre as injeções; (b) a fase móvel utilizando dióxido de carbono é inerte, ambientalmente "verde" e eficiente para a separação em larga escala; (c) bancos de colunas em série, com as mesmas ou múltiplas fases, com um total de pratos teóricos superior a 100.000, (d) seletividade que corresponde HPLC de fase reversa e ajustável, e ainda (e) os ensaios de HPLC podem ser executado na instrumentação de SFC. Porém ao trabalhar com compostos solúveis em água o HPLC de fase reversa continua a ser a primeira escolha. Mas para certas aplicações, tais como separações quirais de alto rendimento, o SFC apresenta suas vantagens.

2.4.3 Aplicações em produtos naturais

Os compostos ativos, antimicrobiano (AM) e antioxidante (AO) possuem considerável interesse e tem recebido mais e mais atenção devido às suas propriedades bioativas. Os compostos fenólicos estão entre os mais desejáveis fitoquímicos devido a sua propriedade antioxidante. Esses compostos são conhecidos como metabolitos secundários das plantas e possuem também atividade antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória juntamente com a sua alta atividade antioxidante. Muitos esforços tem sido feito afim de se desenvolver métodos de alta sensibilidade e seletividade para determinação e caracterização desses compostos (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

A natureza química do composto chamado davanana, iso-

lado do óleo de davana (*Artemisia pallens*) via pSFC com fase móvel CO₂ foi determinada (COLEMAN et al., 2007). Foram testadas várias fases estacionárias com base sílica. A separação em escala semi-preparativa, a qual rendeu três frações, foi desenvolvida em uma coluna de sílica ligada com 2-etilpiridina (250 x 10 mm, 5 μ m). A fração de davanana foi quase 100% pura opticamente. Os resultados indicaram que o fracionamento do óleo de davana com fluidos supercríticos perto da temperatura ambiente teve pouco efeito sobre a integridade óptica da amostra. Peptídeos relativamente grandes (de no mínimo 40mers) contendo uma variedade de resíduos ácidos e básicos foram eluídos através da SFC. O ácido trifluoroacético foi utilizado como um aditivo na fase móvel CO₂/etanol para suprimir a desprotonação do grupo de ácido carboxílico e protonar grupos aminas dos peptídeos. A coluna de sílica com 2-etilpiridina ligada foi utilizada na maioria deste trabalho. A fase móvel foi relativamente simples, compatível com detecção por espectrometria de massa (COLEMAN et al., 2007).

Ramírez et al. (2005) prepararam colunas cromatográficas capilares empacotadas, conforme Ibáñez et al. (1999), especialmente para avaliar a separação de compostos antioxidantes por SFC utilizando CO₂ puro. O estudo envolveu o uso de partículas de octadecilsilano (ODS) comercial e partículas de sílica revestidas com uma fase estacionária comumente utilizada em cromatografia gasosa, como a CW20M (polietileno glicol) de alta polaridade. De modo a selecionar as condições cromatográficas apropriadas para eluir os compostos antioxidantes de estrutura fenólica, o ácido carnósico foi utilizado como o modelo de molécula, e um estudo teórico da solubilidade foi realizado. O ácido carnósico foi eluído sem utilização de co-solvente, nas condições de 370 bar e a diferentes temperaturas, porém isso ocorreu somente quando partículas revestidas com CW20M foram utilizadas na coluna. A eluição do ácido carnósico não foi possível quando as partículas de ODS (C₁₈) foram testadas, provavelmente devido à forte interação do grupo ácido da molécula com os sítios ativos remanescentes na coluna (RAMÍREZ et al., 2005).

Ramírez et al. (2004) separaram compostos antioxidantes

dos extratos de alecrim obtido por extração supercrítica com um SFC com detector de ionização em chamas e uma coluna capilar empacotada. No trabalho foram utilizadas colunas de sílica revestida com SE-54 (5% fenil, 95% metil silicone) e CW20M (polietileno glicol). A utilização dessas colunas capilares empacotadas permitiu a separação de compostos polares por SFC com CO₂ puro (sem adição de co-solvente). As melhores condições de separação foram (370 bar e 100 °C) para compostos como ácido carnósico e carnosol, enquanto as baixas pressões foram suficientes para separar compostos dos óleos essenciais.

Ramírez et al. (2006) fracionaram o extrato supercrítico de alecrim utilizando um SFC-preparativo. No trabalho foram otimizadas as condições de operação para isolar compostos responsáveis pelas atividades antimicrobiana e antioxidante, descritos como ácido carnósico, metil carnosato e carnosol. Uma coluna LC-Diol (25 cm x 10 mm d.i.) empacotada (dp = 5 μ m) foi utilizada e a separação ocorreu a 80°C da temperatura da coluna e 130 bar de pressão com 10% de etanol como modificador da fase móvel (CO₂). Foram empregados no processo dois separadores tipo ciclone para coletar as frações que eram analisadas por HPLC-DAD, GC e análise antioxidante e antimicrobiana in vitro. Após uma criteriosa seleção das condições operacionais foi possível obter dois extratos diferentes, um rico em compostos antioxidantes e antimicrobianos (com um aumento de 20% e 40% na atividade antioxidante e antimicrobiana, respectivamente, comparada ao extrato original) coletado no ciclone 2 e com nenhum residual de aroma e outro contendo o óleo essencial.

Ramírez et al. (2007) desenvolveram uma nova coluna especialmente para fracionar o extrato de alecrim por SFC com um coletor de frações já descrito por Aruoma et al. (1993). A coluna foi preparada com um novo método de empacotamento que consiste na combinação de uma mistura e CO₂ supercrítico com partículas de sílica comercial revestidas com uma fase estacionária utilizada em GC, como a SE-54. O novo procedimento propicia o desenvolvimento de colunas com razoável eficiência e alta estabilidade a altas pressões. A coluna (25 cm x 10 mm d.i.) empacotada com sílica revestida com 3% de SE-54 foi pre-

parada e seu poder de separação foi testado isolando frações com alta atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato SC de alecrim. Os grupos de compostos separados foram o ácido carnóico, metil carnosato e o carnosol, como responsáveis em grande parte pelas atividades antimicrobiana e antioxidante (RAMÍREZ et al., 2007). Sendo que os compostos como cânfora, borneol, linalol, verbenona e 1,8 cineol apresentaram também alta atividade antimicrobiana (PATtnAIK et al., 1997; ANGIONI et al., 2004; SACCHETTI et al., 2005; SANTOYO et al., 2005; CELIKTAS et al., 2007; RAMÍREZ et al., 2007; KLANCNIK et al., 2009; ZIBETTI; BOLZAN; MARANGONI, 2009).

Han et al. (2006) publicou um estudo sobre a separação da coenzima Q_{10} (antioxidante dez vezes mais poderoso do que a vitamina E) no óleo de palma e na fibra de palma por SFC com detector UV, utilizando metanol como modificador da fase móvel (CO_2) com uma coluna C_{18} Metaphase RP (4,6 mm x 250 mm).

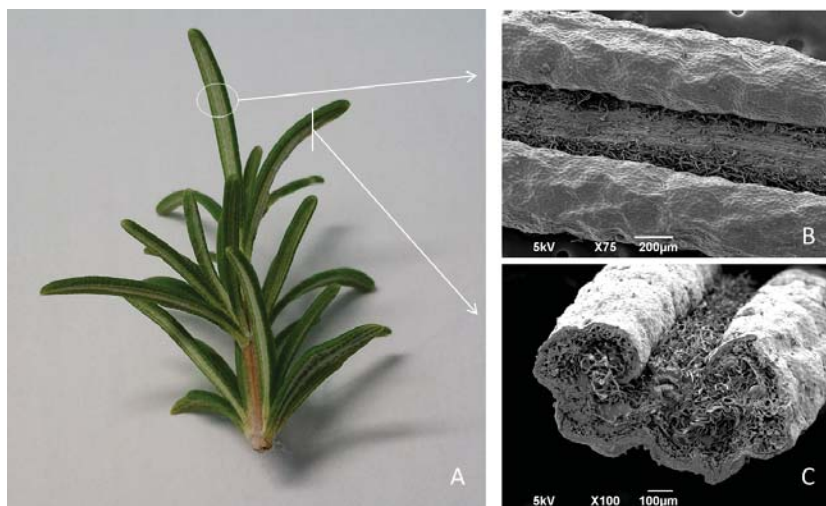
2.5 Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

O alecrim, *Rosmarinus officinalis* é uma planta da família Lamiaceae, originária da Região Mediterrânea e pode ser cultivada em países de clima temperado. É um arbusto perene, ramificado e de caule lenhoso, podendo chegar até a 2 m de altura. Possui folhas lineares desprovidas de pedúnculo, pequenas e finas, a parte inferior é de cor verde-acinzentada e a superior de um verde escuro, Figura 15. Floresce quase todo o ano e não necessita de cuidados especiais no seu cultivo, pode ser propagada a partir de sementes ou mudas da divisão de touceiras ou ramos. É uma das espécies integrantes do projeto "Produção, processamento e comercialização de ervas medicinais, condimentares e aromáticas", coordenado pela Embrapa Transferência de Tecnologia - Escritório de Negócios de Campinas (SP), que está sendo cultivada nas unidades demonstrativas da Embrapa Pantanal (Corumbá, MS), Embrapa Semi-Árido (Petrolina, PE), nos Escritórios de Negócios de Dourados (MS), Canoinhas (SC) e Petrolina (PE) (Corrêa Júnior; MING; SCHEFFER, 1994; SARTÓRIO et al., 2000; EMBRAPA, 2006).

May et al. (2010) estudaram o influência da altura de corte e do intervalo destes sobre a produção de biomassa e no rendimento do óleo essencial de alecrim cultivado na região de São Paulo (SP). Determinaram que para intervalos de corte (colheita) de 60 e 120 dias foi possível obter um massa seca da parte aérea da planta de (3,95 e 8,39) t/ha, respectivamente.

O óleo essencial é armazenado em estruturas chamadas de tricomas glandulares, localizada nas folhas da planta, (XIANG et al., 2010). A família da Lamiaceae, engloba muitas espécies aromáticas incluindo o *Rosmarinus*, que tem sido estudado por causa dos óleos essenciais secretados pelos seus tricomas glandulares. Em particular, o óleo essencial secretado pelos tricomas glandulares das folhas de alecrim tem sido utilizado como um conservante de alimentos, anti-séptico e adstringente há um longo período de tempo. Estes tricomas glandulares do gênero *Rosmarinus* são os principais locais de acúmulo de vários metabólitos secundários que possuem propriedades como, inibição de tumori-

Figura 15 – **A** Folhas frescas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **B** Microscopia eletrônica de varredura parte inferior da folha de alecrim (seca). **C** corte na seção transversal da folha (seca).



gênese na pele, atividade antioxidante, proteção das células vermelhas do sangue e atividade anti-leucêmica (HUANG et al., 1994; RICHHELMER et al., ; SHABTAY et al., 2008). Os tricomas glandulares são geralmente classificados morfológicamente em dois tipos principais, peltado e capitato, e podem ser distinguidos pelo tamanho da cabeça e pelo comprimento do pedúnculo. Os tricomas peltados possuem um pedúnculo curto e uma cabeça grande onde os tricomas capitados são providos de um pedúnculo que é duas vezes a sua cabeça (ASCENSAO L.; PAIS M.S., 1998). Tricomas peltados tem as cavidades secretoras largas, entre (40 a 60) μm de diâmetro, e os tricomas capitados tem cavidades globulares secretoras, entre (10 a 30) μm de diâmetro (LUO et al., 2010).

Em estudo realizado por Choi et al. (2011), dois tipos de tricomas glandulares, os peltadas e capitatos e os tricomas não glandulares foram investigados nas folhas de *Rosmarinus officinalis* por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram determinadas a origem e o desenvolvimento dos produtos de secreção, assim como o padrão de compartimentação dos compo-

nentes das cavidades secretoras e a origem das paredes das células subcuticulares. Observaram dois tipos muito distintos de tricomas glandulares nas folhas de alecrim, mais especificamente na superfície adaxial (parte superior da folha). No entanto, na região abaxial (parte inferior da folha), ambos, tricomas peltados e capitados estavam densamente distribuídos. Os tricomas não-glandulares (tectores) apareceram particularmente no veio central da folha como multi-células em formato estrelado e de pontas afiadas. [Marin et al. \(2006\)](#) estudaram os tricomas na folhas de alecrim utilizando microscopia de fluorescência e observaram que os compostos fenólicos foram encontrados somente nos tricomas peltados e não nos tricomas capitados.

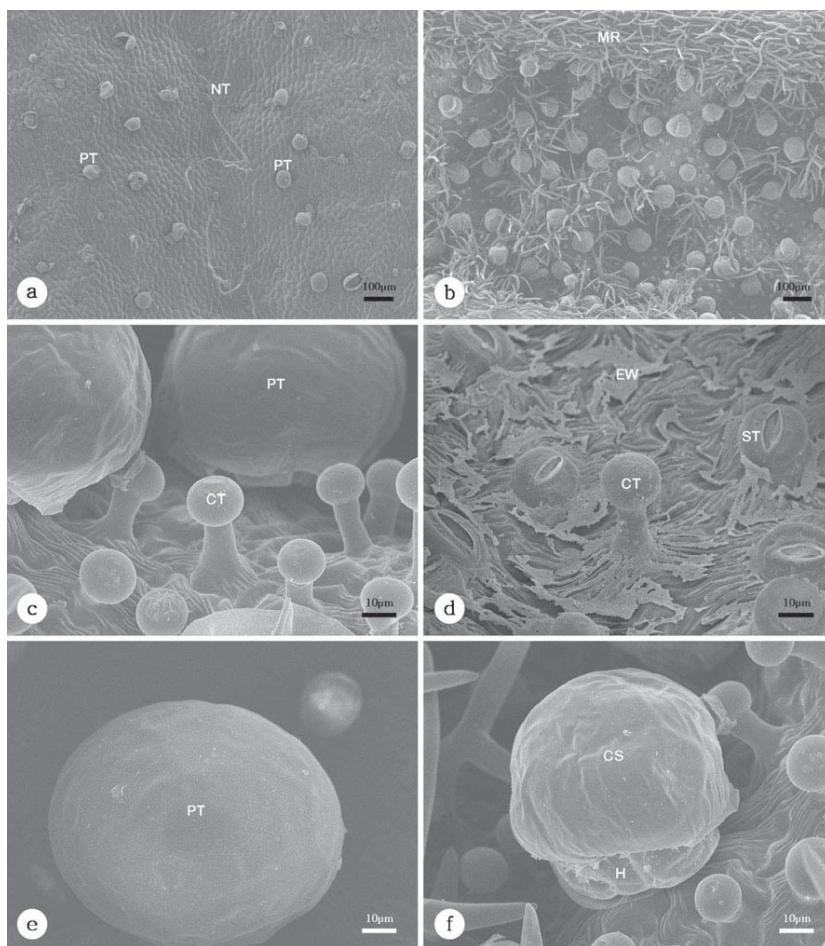
2.5.1 Composição química do extrato de alecrim

A composição química dos extratos depende fortemente das condições climáticas, do solo, da idade e ainda do modo de extração do conteúdo da planta. Os extratos do alecrim em sua maioria são constituídos principalmente de compostos terpênicos. Os terpenos são divididos em diferentes grupos: Hemiterpenos, Monoterpenos, Sesquiterpenos, Diterpenos, Triterpenos, Tetra-terpenos e Politerpenos. O óleo essencial do alecrim é constituído basicamente de monoterpenos e sesquiterpenos e seu extrato alcoólico pode conter os diterpenos e ácidos fenólicos. Alguns dos diferentes constituintes dos extratos do alecrim estão agrupados na Tabela 4.

2.5.2 Propriedades e compostos ativos do alecrim

Ervas e especiarias têm sido adicionadas aos alimentos desde os tempos antigos, principalmente para modificar ou aprimorar seu sabor. Os vegetais são de longe as fontes naturais mais bem estudadas, pois contém uma variedade enorme de compostos ativos que podem ser utilizados na indústria de alimentos como compostos funcionais ou nutracêuticos. Os antioxidantes de algumas espécies são compostos que, quando presentes em alimentos, em baixa concentração, comparado a um substrato oxidável,

Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura da folha de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **a** Tricoma glandular peltado (PT) e não-glandular (NT). **b** Superfície abaxial da folha com inúmeros tricomas (peltado e capitado) bem como tricomas não-glandulares no veio central da folha (MT). **c** Vista detalhada do tricoma peltado (PT) e do capitado (CT) na superfície adaxial da folha corte. **d** Tricoma capitado (CT) cercado por estômatos (ST), cera epicuticular (EW) na epiderme. **e** Glândula peltada madura (PT). **f** Vista detalhada do tricoma peltado iniciando a ruptura da cutícula e o tricoma peltado maduro após a separação do saco cuticular (CS).



Fonte: Choi et al. (2011).

Tabela 4 – Composição química dos extratos de alecrim. AM - atividade antimicrobiana, AO - atividade antioxidante.

Monoterpenos ($C_{10}H_{16}$)			
Acíclicos	mirceno	$C_{10}H_{16}O$	
	linalol	$C_{10}H_{18}O$ AM	(PATTNAIK et al., 1997)
Monocíclico	4-terpinol	$C_{10}H_{18}O$	
	α -terpineol	$C_{10}H_{18}O$	
	limoneno	$C_{10}H_{16}$ AM	(VUUREN; VILJOEN, 2007)
Aromáticos	para-cimeno	$C_{10}H_{14}$	
Bicíclicos	α -pineno	$C_{10}H_{16}$	
	β -pineno	$C_{10}H_{16}$	
	1,8 cineol	$C_{10}H_{18}O$ AM	(VUUREN; VILJOEN, 2007)
	canfeno	$C_{10}H_{16}$	
	verbenona	$C_{10}H_{14}O$ AM	
	canfora	$C_{10}H_{16}O$ AM	(SANTOYO et al., 2005)
	borneol	$C_{10}H_{18}O$ AM	(SANTOYO et al., 2005)
	acetato de bornila	$C_{12}H_{20}O_2$	
Sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$)			
	óxido de cariofileno	$C_{15}H_{24}O$	
	cariofileno	$C_{15}H_{24}O$	
	humuleno	$C_{15}H_{24}$	
	bisabolol	$C_{15}H_{26}O$	
Diterpenos ($C_{20}H_{32}$)			
Fenólicos	ácido carnósico	$C_{20}H_{28}O_4$ AM AO	(RAMÍREZ et al., 2007)
	carnosol	$C_{20}H_{26}O_4$ AM	(ARUOMA et al., 1993)
	rosmanol	$C_{20}H_{26}O_5$ AM AO	(RAMÍREZ et al., 2007)
Ácidos fenólicos	ácido rosmarínico	$C_{18}H_{16}O_8$ AM AO	(IVANOVIC et al., 2009)
	ácido cafeico	$C_9H_8O_4$	

claramente atrasam ou previnem a sua oxidação (ARUOMA et al., 1993; HALLIWELL, 2001).

Os extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) possuem uma potente atividade antioxidante e são amplamente utilizados na indústria de alimentos. Vários pesquisadores reportaram a efetividade dos extratos de alecrim em alimentos, retardando a oxidação lipídica em pedaços de carne, nas concentrações entre 200 a 1000 mg/kg, sendo nas concentrações próximas a 1000 mg/kg o extrato foi tão efetivo quanto o uso de BHA/BHT (antioxidantes sintéticos amplamente utilizados) em salsichas congeladas (pré-cozidas) (LAWRENCE; SHU, 1993). A atividade antioxidante do extrato do alecrim está associada à presença de diversos diterpenos fenólicos, como o ácido carnósico, rosmanol, rosmarinoquinona e rosmanídeo fenol, que interrompem a propagação das reações em cadeia dos radicais livres pela doação de hidrogênio (SIE; RIJNDERS, 1967). Além da inibição da oxidação lipídica, vários autores reportaram a atividade antimicrobiana dos extratos de alecrim (ARUOMA et al., 1993; ANGIONI et al., 2004; WECKESSER et al., 2007; GENENA et al., 2008; KLANCNIK et al., 2009; ZIBETTI; BOLZAN; MARANGONI, 2009).

Baño et al. (2003) apresentou a variação da concentração de seis compostos com três polifenóis diferentes do *Rosmarinus officinalis*: diterpenos fenólicos (ácido carnósico e ácido 12-O-metil carnósico), derivado do cafeoil (ácido rosmarínico), e flavonas (isoscutelectarein 7-O-glucoside e genkwanin), cada um mostrando um comportamento característico e uma distribuição durante o ciclo vegetativo. Os seis compostos juntos só puderam ser encontrados nas folhas, e as maiores taxas de acúmulo foram relacionadas com estágios iniciais de desenvolvimento da planta. O ácido rosmarínico apresentou a maior concentração de todos os polifenóis em todos os órgãos da planta (folhas, flores e troncos). A distribuição desse ácido nas folhas, flores e troncos sugerem que nos primeiros estágios do crescimento das flores, os níveis estão em uma biosíntese *in situ*, e nos últimos estágios, a distribuição do fenômeno de transporte foi aumentada. A atividade antioxidante dos seis extratos com diferentes composições de polifenóis foi avaliada em sistema aquoso e lipídico. Os resultados

claramente sugerem que os extratos de alecrim são excelentes antioxidantes em ambos os meios, aquoso e lipídico.

2.5.3 Separação e purificação do ácido rosmarínico

Um grande número de patentes internacionais envolvendo o composto ácido rosmarínico foram publicadas, em maior número desde 2002 até 2012. As maiores detentoras das patentes envolvendo esse composto são as empresas farmacêuticas, químicas, alimentícias e de cosméticos, dentre elas Mary Kay, Avon, Colgate, Dow Corning, Unilever, Solae etc, (fonte WIPO - World Intellectual Property Organization). No Brasil existe apenas um pedido de patente envolvendo o composto (em fase de análise), e se trata de um pedido depositado em 2008, envolvendo a sua obtenção a partir do *Origanum vulgare* (orégano) e sua aplicação no tratamento de diabetes (CUNHA et al., 2008). Na referida patente o método de extração foi realizado por infusão em água, maceração em etanol/água (95:5) e solução água/ácido acético (85:15) e precipitação com hidróxido de cálcio.

Christ e Kesselring (1982) patentearam um processo para isolar o ácido rosmarínico de plantas em específico da erva-cidreira (*Melissa officinalis*). Foi requerida a proteção do processo de extração, que compreendia basicamente em utilizar água para extração entre (80 a 100) °C por de (30 a 60) min, sob agitação, acidificando o extrato a um pH entre 2 a 2,5, seguido de uma extração líquido-líquido do extrato acidificado com um solvente orgânico (preferencialmente éter dietílico ou éter diisopropílico) seguido de processos de lavagem, filtração e evaporação do solvente.

Haworth (2002) patenteou um processo para obter os compostos antioxidantes e o óleo essencial de espécies da família das Lamiaceae (incluindo o alecrim), envolvendo os passos de extração com solventes orgânicos (preferencialmente tetraidrofurano) e misturas de acetona, etanol, metanol, propano e hexano, seguido da remoção do solvente, evaporação do óleo essencial e sua condensação, e obtenção do resíduo da evaporação como extrato antioxidante.

Kott e Fletcher (2010) patentearam o uso de uma variedade da planta hortelã (*Mentha spicata*) com alto teor de ácido rosmarínico (70 a 150) *mg/g*, método de extração e as aplicações do extrato concentrado dessa variedade em bebidas e cosméticos.

Nahas, Barren e Reynhout (2012) patentearam o processo de preparação de antioxidantes solúveis em água e óleo, extraídos juntos, de ervas da família Labiatae em uma única extração utilizando álcool e água, seguido de uma simples e efetiva etapa de purificação que permite a separação da fração de antioxidantes solúveis em água (contendo ácido rosmarínico) e uma fração contendo principalmente ácido carnósico e o carnosol, sem o uso de etapas de particionamento com ácidos e bases.

2.6 Considerações sobre o estado da arte

Segundo a revisão bibliográfica aqui apresentada pode-se observar que muito tem sido feito no intuito de desenvolver técnicas extrativas visando o beneficiamento de matérias-primas, dentre elas o alecrim. Outras potencialidades tratadas sobre os compostos de alto valor agregado, presentes nesse material vegetal, como possíveis constituintes em novos fármacos e ainda em aplicação na indústria de alimentos. Muitas das técnicas extrativas envolvem o uso de CO₂ supercrítico, e o uso de solventes orgânicos como acetona, acetonitrila e metanol. No caso da extração com CO₂ supercrítico observa-se que esse solvente apresenta uma boa capacidade de solubilização de compostos terpênicos, dos quais fazem parte compostos como o α -pineno, eucaliptol, borneol, limoneno, cânfora, cariofileno entre outros que apresentam atividade biológica comprovada, como agentes antimicrobianos. Ainda com o uso de altas pressões (superiores a 350 bar) e temperaturas superiores a 80 °C, foi possível extrair alguns compostos polares, como o ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico, com propriedades antioxidantes (PENG et al., 2007). No que tange aos procedimentos de extração supercrítica do extrato de alecrim, já foram bastante estudados ao longo desses últimos anos, porém pouco é tratado quando se diz respeito ao fracionamento dos seus compostos durante os estágios desse processo.

Além disso extratos etanólicos obtidos por técnicas convencionais de extração das folhas do alecrim apresentaram alto poder antioxidante em produtos alimentícios, como a manteiga (ŻEGARSKA et al., 1998), o que demonstra a grande aplicabilidade dos extratos obtidos dessa planta. Os incentivos para o cultivo dessa e de outras plantas (EMBRAPA, 2006) e de sua capacidade produtiva de massa folhear por hectare (MAY et al., 2010), fazem desse material vegetal altamente atrativo ao uso em uma cadeia produtiva de compostos de alto valor agregado.

De uma maneira geral é interessante notar que existe um crescente número de estudos a respeito das propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatória e antitumoral dos compostos bioativos dessa planta. Ainda poucas pesquisas fo-

ram realizadas com aplicação em produtos alimentares, porém vem gerando grande interesse da comunidade acadêmica (ABDOLLAHI; REZAEI; FARZI, 2012). Porém as técnicas de separação e purificação de compostos bioativos, em especial os compostos polares, na maioria dos casos é realizada com o uso de demoradas técnicas de extração sólido-líquido, seguindo de extrações líquido-líquido, que geram grandes quantidades de resíduos de solventes orgânicos (tóxicos), que muitas vezes restringem o uso do produto final. Nota-se que grande parte dos estudos não se valem dos fatores econômicos e menos ainda da possibilidade de produção em escala para aplicação dos mesmos.

Com a pretensão de propor técnicas bem estabelecidas para a produção de compostos de alto valor agregado, faz-se necessário uma avaliação global de cada caso. Dessa maneira buscou-se nesse trabalho de revisão trazer a tona alguns informações pertinentes quanto à atratividade que é gerada quando são reunidas as informações necessárias para à aplicação de um processo, com o uso de tecnologias já desenvolvidas, e de suas potencialidades.

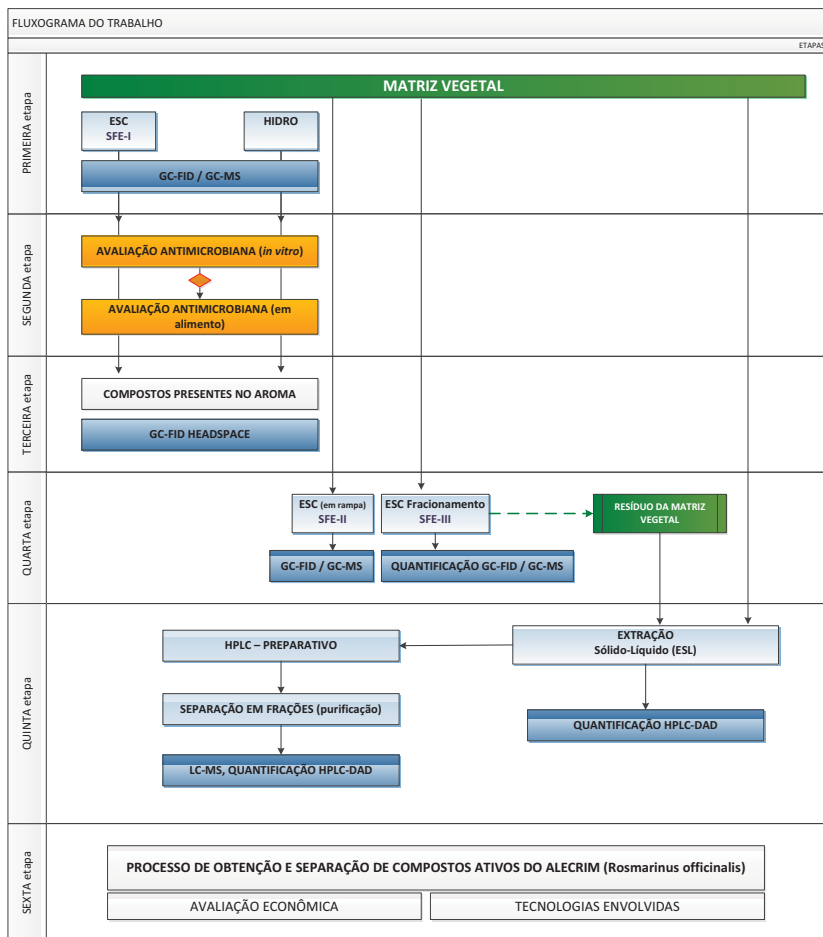
No Brasil, as tecnologias de produção de compostos bioativos de alto valor agregado é escassa, visto o quase inexistente número de patentes que envolvem, em particular, a proteção de técnicas de obtenção e purificação de compostos oriundos de fontes vegetais com propriedades ativas, como é o caso do alecrim. Dessa forma mostra-se aqui uma oportunidade de desenvolvimento de uma aplicação tecnológica que sirva de base para a indústria nacional, para que se possam estimular a exploração, ambientalmente correta, da vasta cadeia de matérias-prima que são cultivadas no país.

3 Materiais e métodos

3.1 Introdução

O presente trabalho foi dividido em 6 etapas, onde a primeira etapa consistiu em obter o óleo essencial e o extrato de alecrim via hidrodestilação e extração com CO₂ supercrítico e caracterizá-los quanto a sua composição química. A segunda etapa consistiu em avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos frente a alguns microrganismos patogênicos encontrados em alimentos e testa-los diretamente no produto (presunto cozido embalado à vácuo) a fim de avaliar o aumento da sua vida de prateleira. A terceira etapa referiu-se a identificação dos compostos que são responsáveis pelo aroma no extrato e na matriz vegetal. A quarta etapa visou a separação de grupos de compostos antimicrobianos, por fracionamento durante a extração supercrítica utilizando diferentes técnicas. A quinta etapa foi a de obtenção e separação dos compostos antioxidantes (compostos polares) não obtidos pelas técnicas anteriores. A partir dessa etapa foram desenvolvidas metodologias de análise e quantificação dos compostos utilizando GC-FID, HPLC-DAD. Um HPLC-Preparativo foi utilizado na fase de desenvolvimento do processo de separação do composto alvo, em uma ampliação de escala (cerca de 500× a escala analítica). A última etapa do trabalho consistiu em planificar o processo de obtenção dos compostos bioativos responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante onde uma avaliação econômica foi elaborada para verificação da viabilidade de implementação desse processo produtivo, a Figura 17 exemplifica as etapas desse trabalho.

Figura 17 – Fluxograma simplificado das etapas realizadas nesse trabalho, envolvendo, extração, avaliação antimicrobiana, determinação da composição química dos extratos e da fração aromática, fracionamento, quantificação química dos compostos majoritários, separação e purificação, e avaliação econômica desses processos.



3.2 PRIMEIRA etapa

Nessa primeira etapa foram realizados ensaios de extração de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) de origem brasileira. As extrações foram realizadas pelos métodos de Extração Supercrítica (ESC), e por Hidrodestilação (HD) onde os extratos foram caracterizados quanto a sua composição química por cromatografia gasosa. Ainda foi realizada uma análise da cinética de extração supercrítica assim como a obtenção dos valores de solubilidade do extrato em CO₂ (150 bar e 35 °C), obtidos a partir da concentração de saturação sob diferentes condições de vazão.

3.2.1 Preparação da matéria-prima

O alecrim, RO, proveniente de São Paulo foi adquirido no SEASA-SC (Florianópolis) ainda fresco e mantido sob-refrigeração. Imediatamente após sua aquisição o material vegetal foi submetido à secagem em estufa com circulação e renovação de ar (MA035, Marconi, Brasil) a 37 °C por aproximadamente 48h. As folhas foram separadas dos galhos e submetidas a moagem em moinho de facas (MA580, Marconi, Brasil). Uma pré distribuição do tamanho de partícula foi realizada na peneira do próprio moinho com abertura de 0,545 mm. O material particulado foi novamente peneirado (Mesh Tyler 65 [0,212 mm] e 80 [0,180 mm]), separado colocado em embalagem hermeticamente fechada e estocada em freezer doméstico (Brastemp, Modelo Frostfree, Brasil) sob temperaturas abaixo de -10 °C. Para as extrações realizadas no *Laboratoire Réactions et Génie des Procédés* (LRGP) (Nancy, França), durante a quinta etapa, o procedimento de secagem e embalo da planta foi o mesmo e a moagem foi realizada momentos antes da extração com subsequente peneiramento em série de peneiras de Mesh 30 [0,590 mm], 40 [0,420 mm] e 70 [0,210 mm].

3.2.2 Caracterização da matéria-prima (leito de extração)

A densidade da partícula vegetal (ρ_s) foi determinada no Laboratório de Materiais (LabMat), do Departamento de Engenharia de Mecânica da UFSC, pelo método de picnometria de gás hélio. Nessa técnica, o gás hélio penetra nos poros do material sólido e nos espaços vazios entre as partículas, garantindo maior precisão. O picnômetro a gás determina o volume verdadeiro de um sólido, mesmo que poroso, por variação da pressão de gás numa câmara de volume conhecido. Para a medida utilizou-se o multipicnômetro, marca Quanta Chrome. A densidade aparente do leito de partículas vegetais (ρ_a) foi calculada por meio da medida da massa de planta (g) utilizada para ocupar o volume interno do extrator ($V_{extrator}$) utilizado no experimento de extração, segundo a equação (3.1).

$$\rho_s = (m_{planta}/V_{extrator}) \quad (3.1)$$

A porosidade total do leito (ε) com partículas de alecrim foi calculada utilizando a densidade do sólido (ρ_s) e a densidade aparente do leito (ρ_a), conforme a equação (3.2).

$$\varepsilon = 1 - (\rho_a/\rho_s) \quad (3.2)$$

3.2.3 Procedimento de extração supercrítica (ESC)

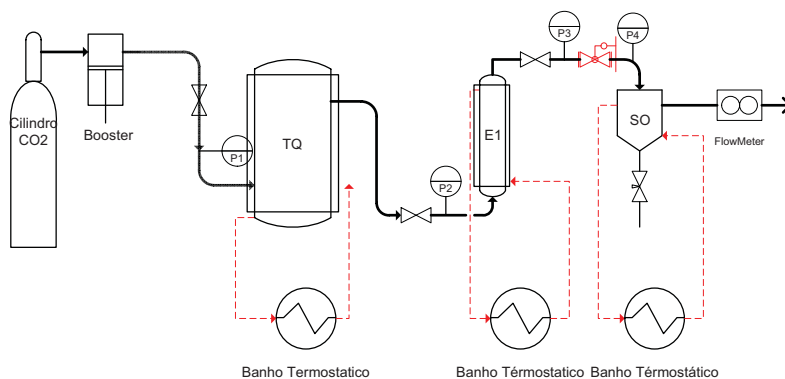
Foram três as unidades de extração supercrítica utilizadas nesse trabalho, denominadas SFE-I, II e III, duas localizadas no Laboratório de Controle de Processos da UFSC (LCP/EQA/UFSC), SFE-I e II, e a terceira, SFE-III, localizada no [LRGP](#) da *Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques* ([ENSIC](#)) do *Institut National Polytechnique de Lorraine - Nancy* ([INPL](#)), na França. A primeira unidade (SFE-I) foi utilizada para avaliação do rendimento da ESC de alecrim, caracterização de sua composição

química e acúmulo de extrato para posterior testes de atividade antimicrobiana. A unidade SFE-II foi utilizada para avaliar o fracionamento do extrato com degraus de pressão ao longo da extração. E a SFE-III foi utilizada com o intuito de avaliar o fracionamento do extrato com separadores ciclônicos.

A unidade piloto SFE-I possui vasos de pressão todos encamisados e construídos em aço inox 316L denominados: Extrator (E1) com volume interno de 0,175 L ($0,175 \times 10^{-3} \text{ m}^3$); Tanque Pulmão (TQ) volume interno de 4,7 L ($4,7 \times 10^{-3} \text{ m}^3$); Separador de óleos (SO), volume interno de 0,660 L ($0,66 \times 10^{-3} \text{ m}^3$); válvulas (Swagelok), compressor de ar, booster de CO₂ (Maxximator), banhos termo e criostático e instrumentos de controle e monitoramento do processo, tais como transdutores de pressão, termopar, medidor de vazão e software de aquisição de dados, Figura 18. As extrações realizadas na unidade SFE-I utilizaram 0,06 kg de matriz vegetal. A densidade aparente do leito foi mantida constante. O leito sólido da matriz vegetal ocupou cerca de 92% do volume total do extrator. O espaço vazio foi preenchido com esferas de vidro de 3 mm de diâmetro e algodão. Foi utilizado dióxido de carbono (CO₂) 99,9% puro (Oxilar, Brasil) como solvente. O tempo de extração foi determinado a cada extração, com duração média de 180 min. A temperatura e pressão foram mantidas constantes durante toda a extração e o fluxo de CO₂ foi ajustado e determinado.

A segunda unidade extração SFE-II (HPLC-SC da Jasco Inc., Japão), com opção de extração e cromatografia supercrítica, composta por três bombas de alta pressão, bomba de CO₂ (P1), bomba de co-solvente (P2) e bomba de eluente (P3), estufa de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-Vis em linha, válvula *back-pressure* automatizada (BP), sistema de aquecimento (H) controlado para amenizar o efeito de resfriamento provocado pela expansão do CO₂ (Efeito Joule-Thompson), Figura 19. O vaso de extração (E) com volume interno de 0,010 L ($0,010 \times 10^{-3} \text{ m}^3$) foi utilizado, com filtro de 10 μm na saída do extrator, para evitar a contaminação com particulados sólidos na linha. As extrações realizadas na unidade SFE-II utilizaram 0,004 kg de matriz vegetal. A densidade apa-

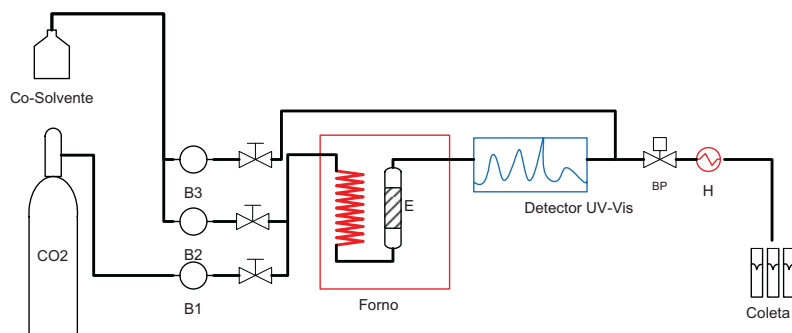
Figura 18 – Unidade de extração SFE-I (LCP - UFSC). TQ - Tanque pulmão, E - Extrator, SO - Separador de óleo



rente do leito foi mantida constante. O leito sólido da matriz vegetal ocupou cerca de 98% do volume total do extrator. Foi utilizado dióxido de carbono (CO_2) 99,99% puro (Oxilar, Brasil) como solvente e Álcool Etílico Absoluto (grau HPLC, JT.Baker) como co-solvente e eluente. O tempo de extração foi determinado a cada extração. A temperatura e a vazão de CO_2 foram mantidas constantes durante toda a extração. O intervalo de coleta utilizado foi de 3 a 25 min e não foi utilizado período estático nessas extrações. Após a extração os frascos de amostra com eluente foram submetidos a secagem, em estufa a 31°C por 48h ou até a eliminação do solvente.

A terceira unidade de extração SFE-III (Separex, Nancy-França), localizada no [LRGP](#), representado na Figura 20. O aparato de extração composto por: Extrator (E1) com volume interno de 0,094 L ($0,094 \times 10^{-3} \text{ m}^3$); três separadores de óleo tipo ciclone (SP1, SP2, SP3) com volume interno de 0,040 L ($0,040 \times 10^{-3} \text{ m}^3$); válvulas (Top-Industrie, França), transmissor de fluxo mássico e densidade (Micro Motion, DH100S e RFT9739), bomba de CO_2 (Milton Roy, pressão max. 250 bar), bomba de co-solvente (bomba HPLC, Gilson 305), banhos termo e criostático e instrumentos de controle e monitoramento do processo, tais

Figura 19 – Unidade de extração SFE-II (LCP - UFSC). B - Bomba HPLC, E - Extrator, BP - Válvula Backpressure, H - Aquecimento



como transdutores de pressão, termopar, medidor de vazão. As extrações realizadas na unidade SFE-III utilizaram 0,025 kg de matriz vegetal. A densidade aparente do leito foi mantida constante. O leito sólido da matriz vegetal ocupou cerca de 92% do volume total do extrator. O espaço vazio foi preenchido com esferas de vidro de 3 mm de diâmetro e lã de vidro. Foi utilizado dióxido de carbono (CO₂) com grau de pureza de 99,99%, como solvente. O tempo de extração foi determinado a cada extração, com duração média de 180 min. A temperatura e pressão foram mantidas constantes durante toda a extração e a vazão de CO₂ foi ajustada e determinada.

As características resumidas das plantas de extração estão mostradas na Tabela 5.

As extrações foram divididas em três tipos. Uma extração visando o acúmulo de extrato (SFE-I) para fins de aplicação em produto alimentício para ensaios de vida de prateleira. E outro tipo de extração (SFE-II) visando a obtenção da cinética das curvas de extração e determinação da solubilidade experimental do extrato em CO₂. E por último, foram realizadas extrações fracionadas (SFE-II e SFE-III), onde foi avaliado o fracionamento em função das condições de extração (SFE-II) e outra envolvendo o fracionamento do extrato em função das condições de separação

Figura 20 – Unidade de extração SFE-III (LRGP - ENSIC). E - Extrator, S - Separador 1, 2 e 3.

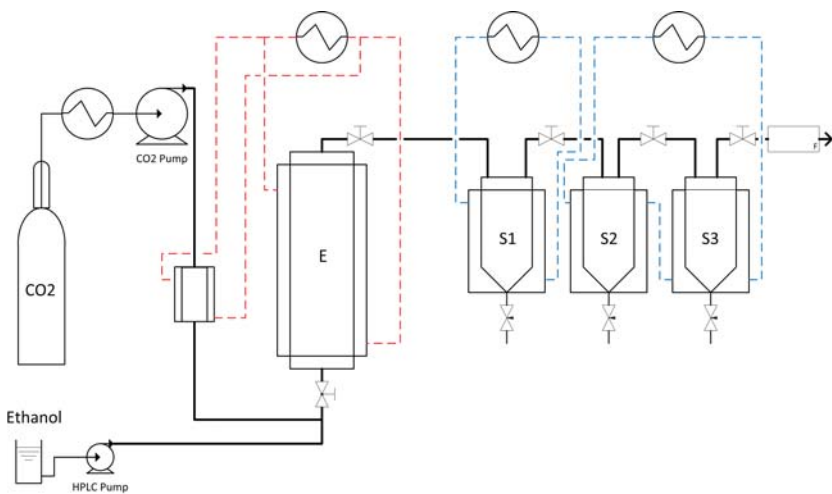


Tabela 5 – Característica das unidades de extração supercrítica SFE’s utilizadas.

		SFE		
		I	II	III
Extrator	volume (mL)	165	10	94
	pressão max. (bar)	150	350	250
Separadores		1	-	3
Bomba		-	3	2
Booster		1	-	-

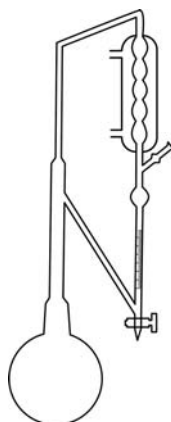
(SFE-III).

3.2.4 Procedimento de extração por hidrodestilação

O processo de hidrodestilação foi realizado utilizando um aparelho tipo Clevenger, Figura 21 com um balão de 5 Litros e manta de aquecimento. Aproximadamente 300 g de alecrim seco e moído foram utilizados em cada batelada, com duração de 180 min, ou até que o volume de óleo essencial coletado se mantivesse

constante. A curva de extração foi determinada medindo-se o volume de óleo a cada 10 *min*, assim como a vazão de vapor através da medida do volume de condensado.

Figura 21 – Aparelho tipo Clevenger utilizado na hidrodestilação do alecrim.



3.2.5 Caracterização do extrato

A caracterização dos extratos nessa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Controle de Processos (LCP-UFSC) por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID, Shimadzu GC-2010) e no Laboratório de Energia e Meio Ambiente (LEMA-UFSC) por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu GCMS-QP2010 Plus).

3.2.5.1 Cromatografia Gasosa

A identificação dos compostos foi baseado no tempo de retenção e comparação quantitativa foi baseada na área absoluta do pico e nos dados normalizados, para evitar interpretações equivocadas da concentração dos compostos nas diferentes amostras. Dessa forma a comparação entre as amostras, nessa etapa do trabalho (PRIMEIRA etapa), foi feita comparando-se a área absoluta dos picos, no mesmo tempo de retenção. Assumiu-se para

efeito de comparação, um erro experimental de até 5 % na obtenção da área do pico. Esse erro pode ser devido à diferença de volume injetado (minimizado pelo injetor automático de alta precisão) e/ou pela metodologia de integração do pico (erro esse minimizado utilizando-se os mesmos parâmetros de integração para todos os picos dos cromatogramas).

Na etapa posterior (QUINTA Etapa) foi desenvolvida uma metodologia que permitiu a quantificação dos compostos majoritários.

3.2.5.2 Condições de análise GC-FID

As análises cromatográficas dessa etapa foram realizadas com um GC-FID (Shimadzu GC2010 Plus + AOC 5000) equipado com uma coluna RTX-5 (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma pressão constante de 100 *kPa* e as condições de operação foram: temperatura do injetor e do detector de 250 °C e 300 °C, temperatura da coluna 50 °C por 1 min até 270 °C a uma taxa de 5 °C/min, por 10 min e aumentado a 300 °C a uma taxa de 20 °C/min mantido por mais 5 min. Foi utilizado uma taxa de split (5:1). O GC era equipado com um injetor automático (Shimadzu, AOC 5000), o volume injetado foi de 1 μL .

3.2.5.3 Condições de análise GC-MS

As análises cromatográficas com espectro de massa a foram realizadas com um GC-MS (Shimadzu GCMS-GC2010-QP2010 Plus) equipado com uma coluna RTx-5MS (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi o hélio, a uma pressão constante de 100 *kPa*, e as condições de operação foram: temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C, temperatura da coluna 50 °C por 1 min até 300 °C a uma taxa de 5 °C/min, mantido por 10 min. Foi utilizada uma taxa de split (10:1). O volume injetado manualmente foi de 1 μL . No espectrômetro de massas (EM) foram utilizadas as seguintes temperaturas: temperatura da fonte de íons (250 °C), temperatura de interface (250 °C). A faixa de massa monitorada foi de 50 a

600 m/z . O software de gerenciamento utilizado foi o GCMS Solutions da Shimadzu e a biblioteca de compostos foi a NIST05s. Ambas as metodologias estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de cromatografia gasosa utilizados na Primeira etapa

Parâmetros	GC-FID	GC-MS
Equipamento	Shimadzu GC-2010 AOC 5000 (injetor aut.)	Shimadzu GCMS QP2010 Plus Injeção manual
Coluna	RTx-5 30 m x 0,25 mm - filme 0,25 μm	RTx-5MS 30 m x 0,25 mm - filme 0,25 μm
GC		
Temp. Injeção	250 °C	250 °C
Gás de arraste	Nitrogênio	Hélio
	50 °C por 1 min	50 °C por 1 min
Rampa de temp.	270 °C a 5 °C/min por 10 min 300 °C a 20 °C/min por 5 min	300 °C a 5 °C/min por 10 min

3.3 SEGUNDA etapa

Foram realizados ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato supercrítico (SC) e hidrodestilado do alecrim de origem brasileira, frente a alguns microrganismos patogênicos *in vitro*, estes responsáveis pela contaminação de alimentos cárneos. Os extratos também foram avaliados em contato direto com o alimento (presunto cozido embalado à vácuo), objetivando o aumento de vida de prateleira desse produto.

3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos *in vitro*

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Análises (LABCAL) no Centro de Ciências dos Alimentos (CCA) da UFSC. A atividade antibacteriana do extrato puro e diluído em Tween 80 (fração volumétrica de 50 %) foi avaliada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se três variantes: difusão em poços (20 μL), difusão em discos (10 μL) e difusão em gota (10 μL). Todos os testes foram realizados em quadruplicata.

Os microrganismos indicadores utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). As cepas selecionadas foram previamente ativadas em caldo tripton de soja (TSB) suplementado com extrato de levedura (0,6 %, *m/v*), incubado a 37 °C por 24 h, e diluídas em água peptonada (0,1 %) até aproximadamente 10^6 UFC/mL . Placas contendo ágar tripton de soja (TSA) suplementado com extrato de levedura (0,6 %, *m/v*) foram inoculadas com 0,1 *mL* da suspensão bacteriana, sendo posteriormente aplicado o extrato de alecrim, de acordo com as metodologias utilizadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e após o período de incubação foi realizada a medida do raio do halo de inibição, desconsiderando o diâmetro do disco, poço ou gota.

3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em presunto cozido embalado a vácuo, comercial

A atividade antibacteriana do extrato puro e do seu óleo essencial foi avaliada em um produto cárneo comercial, presunto cozido embalado a vácuo, produto composto basicamente de carne suína (pernil suíno), proteína de soja, água, sal e açúcar. Foi avaliado o efeito antimicrobiano no alimento em presença de seus constituintes, como aditivos (nitrito de sódio e isoascorbato de sódio). Nesse primeiro momento não foi avaliado a qualidade sensorial do produto e sim somente o crescimento microbiano em presença de extrato SC e do óleo essencial de alecrim. Foram coletadas as amostras de produto na indústria logo após seu processamento (fatiamento e embalagem), armazenado em caixa de EPS expandido, com gelo, mantendo o produto refrigerado e em seguida transportadas até o laboratório para preparação. O tempo de transporte foi de 12 a 18 horas. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório Análises LABCAL, no CCA da UFSC, onde foram preparadas. Os presuntos embalados foram retirados de suas embalagens originais e colocadas em uma nova embalagem contendo os extratos puros sem diluição (concentração de $0,004 \text{ } g_{\text{extrato}}/g_{\text{produto}}$), logo em seguida foram seladas a vácuo e submetidas a refrigeração (7 e 12) °C. O extrato, no momento de sua aplicação, entrou em contato com superfície do produto. A atividade inibitória no crescimento de bactérias lácticas e psicrófilos foram avaliadas durante a vida de prateleira do presunto com tratamento (extrato supercrítico e hidrodestilado) e sem tratamento (controle). As bactérias lácticas presentes nesse produto são responsáveis por provocar exsudação e formação de fluido viscoso não desejável, e as bactérias psicrófilas são bactérias deteriorantes e se desenvolvem facilmente na temperatura de estocagem do produto. Foram escolhidas 7 °C e 12 °C por serem temperaturas de "abuso" no armazenamento desses produtos. Essas são temperaturas normalmente encontradas em gôndolas de produtos refrigerados nos supermercados, (EVANS; SCARCELLI; SWAIN, 2007), sendo 4 °C a temperatura ideal de

armazenamento desse produto cárneo, segundo o fabricante.

3.4 TERCEIRA etapa

Foram realizados ensaios para determinação qualitativa e quantitativa dos compostos presentes no aroma característico do alecrim e seus extratos. Para tanto, foi desenvolvida uma metodologia para determinação da composição da fase vapor em equilíbrio, em diferentes temperaturas. Tais compostos são parte daqueles sentidos pelo olfato humano. Os que apresentam uma maior concentração são mais facilmente perceptíveis.

3.4.1 Determinação dos compostos presentes no aroma do alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

Os ensaios para determinação dos compostos responsáveis pelo aroma foram realizados utilizando a técnica de cromatografia gasosa com coleta direta de *headspace* estático. Foram identificados os compostos da fase gasosa do alecrim seco (folhas), alecrim seco e moído, alecrim seco e moído pós-extração, extrato supercrítico de alecrim (120 bar, 35°C) e extrato hidrodestilado. Foi colocada individualmente a amostra em frascos hermeticamente fechados (frascos de 20 mL), onde permaneceram durante 24 h a temperatura ambiente para equilíbrio. Antes de cada análise cada frasco foi submetido a diferentes temperaturas (30, 45 e 60) °C durante 15 min, em uma incubadora (Shimadzu, Pal Inc. AOC 5000 Incubator) onde foi realizada a coleta da fração gasosa e subsequente injeção no sistema GC. Para a coleta da fração gasosa foi utilizada uma seringa especial para *headspace* com uma cápsula de aquecimento, que foi mantida em temperatura superior à de incubação.

3.4.2 Cromatografia Gasosa de *headspace* estático

Para as análises da fase gasosa da amostra foi utilizado um GIC-FID (Shimadzu GC-2010 + AOC 5000), com uma coluna RTX-5 30 m x 0,25 mm - filme 0,25 μ m, onde a rampa de temperatura utilizada foi a mesma utilizada em análise anterior (seção 3.2.5.1). Foi utilizado o injetor automático (Pal Inc., AOC

5000), equipado com uma seringa (SGE Hamilton, *Gas Tight* 2,5 mL) para coleta de *headspace* acoplada a uma cápsula de aquecimento com controle de temperatura (Shimadzu, Pal Inc., SyrHS 2.5 mL), volume de injeção de 1000 μL , e forno de aquecimento e homogeneização de amostras. A temperatura do forno das amostras foi ajustada para cada experimento e a seringa de coleta e injeção da fase gasosa foi mantida a 80 °C para evitar condensação dos analitos em seu interior.

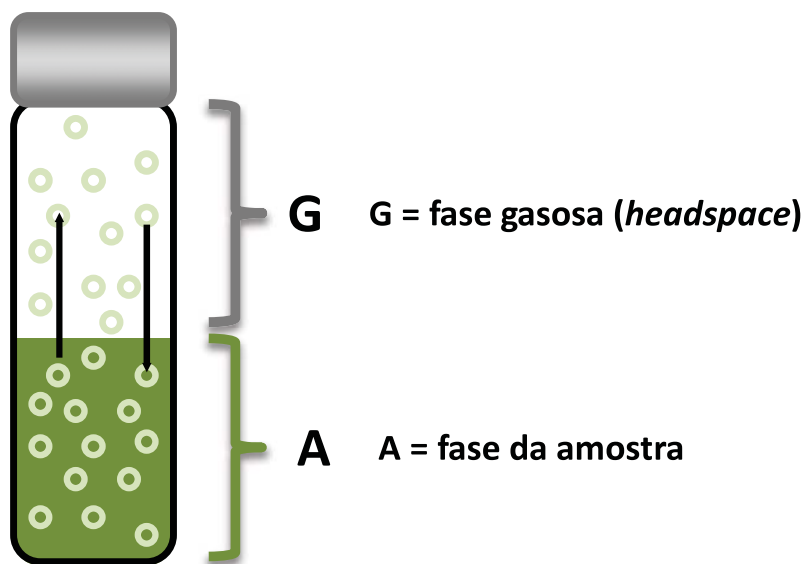
A identificação dos compostos foi baseado no tempo de retenção e comparação quantitativa foi baseada na área absoluta do pico e os dados não foram normalizados, para evitar interpretações equivocadas da concentração dos compostos na amostra. Essa análise foi realizada de forma qualitativa, não visando a quantificação dos compostos em primeiro momento. Ela serviu como base para avaliar os compostos presentes no aroma da planta e seus extratos, como uma espécie de "impressão digital" do aroma de cada amostra. Nesse primeiro momento não foram quantificados os compostos e sim determinada a proporção desses na fase gasosa.

3.4.3 Múltipla Extração de *Headspace* (MHE - *Multiple HeadSpace Extraction*)

Visando aprimorar a análise de headspace estático foi utilizada uma técnica chamada de múltipla extração de *headspace*, *Multiple Headspace Extraction* (MHE), onde são realizadas várias extrações da fase vapor de uma amostra e são utilizadas técnicas para determinação da quantidade mássica do analito na fase gasosa.

Os princípios teóricos dessa técnica foram elucidados por Kolb e Ettre (1997). Para resumir, esse método é uma extração gasosa dinâmica, realizada passo a passo. Após um número de coletas (extrações) consecutivas de uma amostra, a área do pico correspondente à quantidade mássica total do analito presente é determinada. Dessa forma, qualquer efeito de uma matriz (material sólido) é eliminado, e o cálculo da quantidade total de analito presente depende somente de um fator de calibração,

Figura 22 – Um frasco de *headspace* contendo uma amostra líquida: (A) volume da amostra líquida, (G) volume da fase gasosa.



como em outras análises quantitativas em GC. As relações básicas mais importantes dessa técnica serão repetidas nesta seção. Como já descrito, a determinação quantitativa de medidas realizadas em série é baseada em uma regressão linear da área de pico obtida em coletas consecutivas.

$$\ln A_i = -q(i - 1) + \ln A_1 \quad (3.3)$$

onde A_1 é a área do pico obtida na primeira medida e q é a declividade da curva $\ln A_i$ versus o número de extrações $(i - 1)$. A partir do valor da declividade obteve-se o cociente Q :

$$-q = \ln Q \quad (3.4)$$

$$Q = e^{-q} \quad (3.5)$$

que é igual a razão da área de pico obtida em duas medidas consecutivas:

$$Q = \frac{A_2}{A_1} = \frac{A_3}{A_2} = \frac{A_{(i+1)}}{A_i} = e^{-q} \quad (3.6)$$

Nesse cálculo o cociente Q é estabelecido a partir da regressão linear, compensando as variações dos dois valores consecutivos das áreas obtidas (Eq. 3.6). De todos os picos na série de uma análise MHE o primeiro pico em particular A_1 é o mais propício a erros. Desse fato se procedem a coleta de múltiplos pontos. Aplicando-se a regressão linear, obteve-se o valor que intercepta o eixo, chamado de A_1^* , onde pode-se utiliza-lo ao invés do valor da primeira medida A_1 , o qual está embutido uma variação estatística randômica e como sugestão não deve ser utilizado como valor inicial para futura extrapolação, independentemente do quão pequena sua diferença possa parecer. Assim, do valor de Q e A_1^* , a área total correspondente à área total da quantidade de analito presente pode ser calculada como:

$$\sum_{i=1}^{i=\infty} A_i = \frac{A_1^*}{1 - Q} = \frac{A_1^*}{1 - e^{-q}} \quad (3.7)$$

Quando uma alta precisão não for necessária, ou quando for estabelecido que a linearidade é suficientemente boa, a área total pode ser calculada a partir do resultado de duas medidas consecutivas. Assim, a área total pode ser calculada como:

$$\sum_{i=1}^{i=\infty} A_i = \frac{A_1^2}{A_1 - A_2} \quad (3.8)$$

Neste caso utilizou-se as áreas dos pontos experimentais 1 (A_1) e 2 (A_2).

3.4.3.1 Análise quantitativa do *headspace* - Método do padrão externo em MHE

Foi utilizado o método do padrão externo para determinação quantitativa dos compostos na amostra. Essa metodologia se baseia em uma extração exaustiva na amostra. Para isso uma vaporização completa de vários padrões analíticos foi realizada, utilizando-se a técnica da vaporização total, que consiste em vaporizar em sua totalidade uma amostra em um frasco de *headspace* hermeticamente fechado. Múltiplas coletas (extrações)

foram realizadas nesse frasco, e a cada injeção foi obtido um valor de área de pico, onde foi possível calcular a soma das áreas do pico ($\sum A_{ex}$), que correspondiam à quantidade de analito padrão (W_{ex}) presente na fase vapor. Sendo a área do pico e a quantidade do analito proporcionais, a quantidade de analito na amostra (W_i) foi calculada a partir desses dados, onde a soma das áreas do pico obtida na amostra ($\sum A_i$) representavam sua quantidade, calculado como:

$$W_i = \frac{\sum A_i}{\sum A_{ex}} \cdot W_{ex} \quad (3.9)$$

Dessa forma para a calibração dos compostos padrão, foi realizada uma série de coletas em frasco de 20 mL contendo 10 μ L de uma solução com os padrões diluídos em etanol absoluto (99,2 %), segundo a Tabela 7. Assim a cada coleta obteve-se um valor

Tabela 7 – Solução padrão para quantificação em *headspace*.

Composto padrão	Massa (W_{ex}) (mg)	Concentração (C_{ex}) (mg/mL)	Concentração mássica (Cm_{ex}) (mg/mg)
Alpha-Pinene 99%	15,5	0,614	0,0008
Eucaliptol	17,5	0,693	0,0009
(\pm)-Camphor	31,5	1,247	0,0016
(-)-Borneol	14,5	0,574	0,0007
(-)-Bornyl Acetate 95%	19,0	0,752	0,0010

de área de pico onde foi determinada a área total representando a massa total do padrão contido no frasco. A partir dessa correlação as quantificações foram realizadas nas amostras analisadas. Vale salientar que a quantidade de analito determinada durante a análise de uma amostra representou a quantidade de analito na fase vapor da mesma e não a quantidade na amostra.

3.4.3.2 Cromatografia Gasosa de *headspace* estático - MHE

Para as análises de extração múltipla de *headspace* foi utilizado um GC-FID conforme descrito na seção 3.4.2. Em um

frasco de *headspace* (20 mL) foi adicionado 10 μL da solução padrão, Tabela 7, determinada a sua massa, fechado e submetido a evaporação total em forno de homogeneização (agitação de 250 rpm) a 80 °C por 20 min. Em seguida foi realizada a coleta (extração) de 400 μL da fase gasosa e imediatamente injetado no GC-FID. As condições de análise estão descritas na Tabela 8. Foram realizadas 6 coletas sequenciais da fase vapor do frasco, onde foram obtidas as áreas de cada um dos compostos para cada coleta/injeção. A partir desses valores foram determinado os parâmetros para a quantificação.

Tabela 8 – Parâmetros de cromatografia gasosa utilizados na quantificação da fase gasosa - MHE.

Parâmetros	GC-FID
Equipamento	Shimadzu GC-2010 AOC 5000 (injetor automático) Seringa para <i>headspace</i> SyrHS 2.5 mL
Headspace	Frasco 20 mL
Volume de coleta	400 μL
Temperatura de equilíbrio	80 °C
Tempo de equilíbrio	20 min
Agitação	250 rpm
Temperatura da seringa	90 °C
Coluna	RTx-5 30 m x 0,25 mm - filme 0,25 μm
GC	
Temp. Injeção	250 °C
Gás de arraste	Nitrogênio 50 °C por 1 min
Rampa de temp.	190 °C a 5 °C/min por 5 min

Para as amostras de material vegetal sólido, duas amostras diferentes foram analisadas. Amostra de folhas frescas de alecrim (sem tratamento de secagem), denominadas FF, e folhas já secas de alecrim (submetidas à secagem a 37 °C por 48 h). Foram realizadas 5 coletas sequenciais de cada uma das amostras, da mesma forma que as realizadas com a solução padrão. Os parâmetros foram obtidos e a partir daí foram quantificados os compostos no *headspace* das amostras a 80 °C.

3.5 QUARTA etapa

Foram realizados ensaios na tentativa de fracionar os grupos de compostos durante a extração supercrítica, variando o poder solvente do CO₂ e adição de co-solvente ao longo da extração. Extrações visando o fracionamento do extrato foram realizadas com dois procedimentos diferentes, fracionamento em degraus de pressão e outra com o uso de separadores ciclônicos. O procedimento de fracionamento foi realizado utilizando as unidades, SFE-II e SFE-III, explicadas anteriormente (seção 3.2.3).

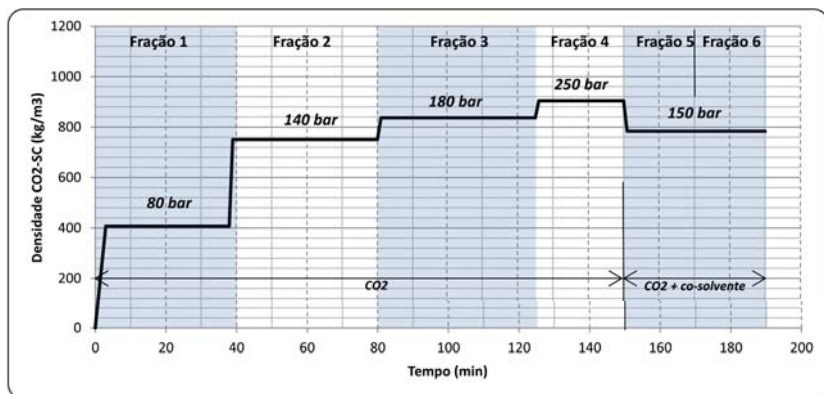
Na SFE-II foi realizado o procedimento de Extração Supercrítica Fracionada (ESCF) com degraus de pressão ao longo da extração, em intervalos de tempo definido. O procedimento de fracionamento na SFE-III se fez com o uso de separadores ciclônicos (PERRUT, 1985).

3.5.1 Extração supercrítica fracionada (ESCF) em degraus de pressão

Os ensaios de fracionamento dos grupos de compostos durante a extração supercrítica, foram realizados variando a pressão do CO₂ e subsequente adição de co-solvente ao longo da extração. Durante a extração foram feitos degraus de pressão durante 40 *min*, em cada condição, a 35 °C e vazão (2 *mL/min*) constante. Nos últimos 40 *min* foi adicionado 15 % de co-solvente etanol (JT.Baker,HPLC), Figura 23.

As coletas foram realizadas durante todo o degrau de pressão constante de cada condição, denominadas de frações, Figura 23. As amostras coletadas foram posteriormente caracterizadas em CG-FID (seção 3.2.5.1). Todas as coletas foram realizadas utilizando etanol (JT.Baker, grau HPLC) como eluente, com exceção das frações que foram extraídas utilizando co-solvente.

Figura 23 – Variação da densidade do CO₂ ao longo da extração fracionada em degrau a 35°C - SFE-II.



3.5.2 Extração supercrítica fracionada (ESCF) em separadores ciclônicos

As condições de extração e separação utilizadas neste experimento estão apresentadas na Tabela 9. Nestes experimentos um procedimento de recuperação foi utilizado após cada extração e a matriz vegetal era retirada do extrator e iniciava-se o processo de recuperação e limpeza com uma mistura de CO₂ a 150 bar e etanol (5 mL/min) com auxílio da bomba de co-solvente. Esse procedimento foi realizado em três etapas, sendo cada uma das etapas isolada em cada um dos separadores. Neste processo era coletada a fração inicial (aproximadamente 5 mL) e o resto era descartado. Encerrava-se esse processo após o recuperado etanólico sair translúcido ou sem coloração. O objetivo dessa etapa foi o de recuperar compostos que se mantinham dentro dos separadores, para posterior análise e quantificação, e evitando deixar resíduos de compostos na unidade para as extrações posteriores.

O fracionamento foi realizado de modo a identificar condições aproximadas de uma pré-separação dos compostos majoritários, visando obter frações concentradas dos grupos de monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos. No primeiro separador (S1) foi reduzida a temperatura e mantida a pressão,

Tabela 9 – Tabela de experimentos de fracionamento, SFE-III

	Extrator		Separador 1		Separador 2		Separador 3	
n°	P	T	P	T	P	T	P	T
20	80	35	80	5	50	3	20	3
21	80	35	80	-4	50	5	20	5
22	80	35	80	5	50	35	20	35
23	80	35	80	-4	50	35	20	35
24	150	35	80	5	50	3	20	3
25	150	35	80	-4	50	5	20	5
26	150	35	80	5	50	35	20	35
27	150	35	80	-4	50	35	20	35

na tentativa de reter os compostos parafínicos. Segundo Reverchon (1992) a solubilidade das ceras cuticulares (assumindo n-octacosane C_{28} como composto parafínico de referência) em CO_2 denso aumenta com a pressão e decresce fortemente com a redução da temperatura (REVERCHON, 1992). A fração de cada separador foi álisada via GC-MS e a quantificação foi realizada utilizando-se um GC-FID. A quantificação dos compostos foi baseada no método do padrão interno para cromatografia gasosa.

3.5.2.1 Cromatografia gasosa

Os compostos voláteis foram separados por GC e o seus tempos de eluição foram monitorados relativamente a uma série de n-alcanos injetados sobre as condições idênticas de análise. O mais utilizado detector é o de ionização em chama (FID), que é utilizado na pesquisa de aromas. O detector responde a todos compostos orgânicos que queimam ou ionizam em sua chama, e é caracterizado por um largo espectro de monitoramento. O programa de temperatura escolhido para a separação dos compostos é dominado exclusivamente por parâmetros como velocidade, resolução e capacidade. A análise quantitativa possui diferentes abordagens como e de que forma o pico é medido e como a mistura de componentes de interesse é quantificada. Pode-se imaginar que é lógico que de modo a quantificar uma mistura para um, dito, composto X, onde tudo que necessitamos fazer é medir

o tamanho de todos os picos em um cromatograma e dividir o tamanho desse pico (X) pelo tamanho total (de todos os picos no cromatograma) (KENKEL, 2003).

Pode-se imaginar que para quantificar uma mistura de um composto X, tudo que precisamos fazer é medir a área desse composto e dividir pela área de todos os picos em um cromatograma, obtendo uma quantidade porcentual do composto em relação ao todo.

$$X = \frac{area_x}{area_{x1} + area_{x2} + \dots + area_{xn}} \quad (3.10)$$

Porém Kenkel (2003) afirmou que, sem uma comparação do pico em questão a um padrão ou uma série de padrões não saberíamos se o resultado é em massa, volume ou porcentagem molar. Ainda sabemos que o detector não responde a todos compostos igualmente, pois eles não possuem a mesma condutividade térmica. Dessa forma eles não possuiriam o mesmo tamanho para uma mesma concentração entre qualquer dois compostos. Assim, a partir da soma de todos os picos obter-se-ia uma quantidade sem significado real, onde a fração do pico X por si só não representaria a sua correta fração total. Ainda, normalmente nem todos os picos são considerados (integrados) em um cromatograma de análise, o que se aproxima ainda mais de um resultado equivocado. Sendo assim, uma metodologia de quantificação que transpusesse tal barreira foi necessária, descrita na subseção 3.5.2.2.

3.5.2.2 Análise quantitativa - Método do padrão interno

Uma vez que o tamanho do pico é proporcional à concentração de cada composto específico, pode-se pensar que preparando uma série de soluções padrão para obter uma curva de concentração *vs* tamanho do pico obtêm-se sua massa corretamente. Porém o tamanho do pico também varia com a quantidade injetada e deve ser considerado erro devido à dificuldade em injetar volumes consistentes, geralmente são injetados volumes na faixa de 1 μL .

Dessa forma nesse método (padrão interno), para todos os padrões e amostras é adicionado uma mesma quantidade de

substâncias conhecidas, denominadas como padrão interno, onde para isso foram utilizados um série de n -alcanos. O propósito desse padrão interno é o de servir como uma referência para o pico que se quer analisar. Assim as variações na técnica de injeção e no volume injetado serão compensadas pelo fato de todos os picos serem afetados pela mesma variação. Assim uma série de n -alcanos (C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{14} e C_{15}) foram selecionados como padrão interno por sua similaridade nas propriedades físico-química com os compostos a serem determinados, sendo eles os terpenos, do α -pineno ($C_{10}H_{16}$) ao *trans*-cariofileno ($C_{15}H_{24}$).

Sendo assim foram preparadas soluções contendo quantidades constantes do padrão interno (série de n -alcanos) onde os compostos a serem quantificados (α -pineno, limoneno, 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetato de bornila e *trans*-cariofileno) foram adicionados em diferentes concentrações. Foi injetado uma quantidade constante (1 μL) dessas soluções em um GC-FID para análise. Dessa forma uma curva de calibração foi criada.

Para a determinação da concentração de cada composto na análise de GC-FID, os dados das curvas de calibração foram utilizados, como segue as equações:

$$C_x = \kappa_x \cdot Area_x \quad (3.11)$$

$$C_{PI} = \kappa_{PI} \cdot Area_{PI} \quad (3.12)$$

onde C_x concentração do composto x , κ_{PI} Fator de Resposta do padrão interno, sendo β uma constante para cada composto x ,

$$C_x = \underbrace{\frac{\kappa_x}{\kappa_{PI}}}_{\beta} \cdot C_{PI} \cdot \frac{Area_x}{Area_{PI}} \quad (3.13)$$

3.5.2.3 Preparação do padrão interno

Os n -alcanos foram preparados em uma solução estoque para serem utilizados como padrão interno. Cada n -alcano foi utilizado como padrão interno (PI) para quantificar um grupo de compostos presentes na amostra, separadamente. A escolha

do composto a ser quantificado utilizando um alceno específico como referência, foi baseado no tempo de retenção. Sendo esse próximo ao do analito.

A massa de 350 μL de cada n-alceno foi precisamente medida em um balão volumétrico de 100 mL , preenchido até metade do seu volume com etanol absoluto (Carlo Erba, França), homogeneizado com vortex por 3 min e então diluído ao volume final e homogeneizado novamente, Tabela 10.

Tabela 10 – Solução estoque de padrão interno, GC-FID

		Massa [mg]	Concentração [mg/mL] [mg/mg]	
Octane	C8H16	251,9	2,519	0,00327418
Nonane	C9H20	249,8	2,498	0,00324688
Decane	C10H22	251,3	2,513	0,00326638
Undecane	C11H24	257,2	2,572	0,00334307
Dodecane	C12H26	259,3	2,593	0,00337036
Tetradecane	C14H30	259,7	2,597	0,00337556
Pentadecane	C15H32	257,0	2,570	0,00334047

3.5.2.4 Preparação dos analitos padrão

Uma solução estoque de compostos padrão contendo α -pineno, limoneno, 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetado de bornila e trans-cariofileno foi preparada. Foi adicionado uma quantidade precisa de massa de cada composto em um balão volumétrico de 20 mL preenchido até metade do seu volume com etanol absoluto (Carlo Erba, França), homogeneizado com vortex por 3 min e então diluído ao volume final e homogeneizado novamente, Tabela 11.

3.5.2.5 Curvas de calibração

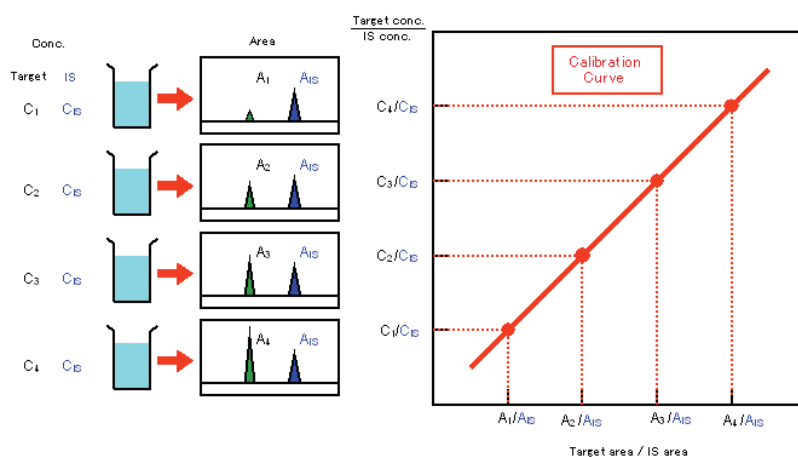
Para fins de quantificação, o método do padrão interno foi utilizado. A razão entre a área de pico do analito e a área de pico do padrão interno $[Area_x/Area_{PI}]$ do cromatograma obtido por GC-FID foi traçado com sua razão de concentração conhecida

Tabela 11 – Solução estoque de compostos padrão, GF-FID

	Concentração do padrão [mg/mL]			
	SS1	SS2	SS3	SS4
α -pineno 99%	0,135	0,270	0,405	0,540
(+)-limoneno	0,142	0,284	0,426	0,568
1,8-cineol 99%	0,162	0,324	0,486	0,648
(-)-cânfora	0,063	0,126	0,189	0,252
(-)-borneol	0,021	0,042	0,063	0,084
(-)-acetato de bornila	0,167	0,334	0,501	0,668
(-)- <i>trans</i> -cariofileno	0,167	0,334	0,501	0,668

$[C_x/C_{IS}]$, Figura 24. Uma equação gerada pela regressão linear foi utilizada para estabelecer o valor da constante β , equação 3.13, para cada par de padrão interno e dos compostos mais próximos, baseado no tempo de retenção (Rt). Estes valores foram utilizados para calcular a concentração dos compostos similares (ex. C_9 foi utilizado para calcular a concentração de α -pineno).

Figura 24 – Exemplo da curva de calibração (Fonte: Shimadzu GC Operation book).



3.5.2.6 Preparação das amostras

Após cada [ESC](#), 10 μL do extrato obtido em cada um dos separadores (1, 2 e 3) foi pesado, diluído em 790 μL de etanol absoluto (Carlo Erba, França) adicionado 200 μL da solução de padrão interno de *n*-alcanos. Após cada procedimento de recuperação e limpeza 200 μL do extrato etanólico obtido na limpeza de cada um dos separadores (1, 2 e 3) foi pesado, diluído em 600 μL de etanol absoluto (Carlo Erba, França) onde foi adicionado 200 μL da solução de padrão interno de *n*-alcanos homogeneizado e submetido à análise GC-FID. Após análise em GC-FID as amostras foram injetadas em GC-MS para identificar os picos não quantificados.

3.5.2.7 Condições de análise GC-FID

As análises cromatográficas dessa etapa foram realizadas com um GC-FID (Shimadzu GC2010 Plus + AOC 20i) equipado com uma coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi hélio a uma pressão constante de 100 *kPa* e as condições de operação foram: temperatura do injetor e do detector foram de 250 °C e 300 °C, temperatura da coluna 50 °C por 1 min até 270 °C a uma taxa de 3 °C/min, por 5 min e aumentado a 300 °C a uma taxa de 20 °C/min mantido por mais 5 min. Foi utilizado uma taxa de split (5:1). O GC era equipado com um injetor automático (Shimadzu, AOC 20i), o volume injetado era de 1 μL .

3.5.2.8 Condições de análise GC-MS

As análises cromatográficas com espectro de massa a foram realizadas com um GC-MS (Shimadzu GCMS-GC2010-QP2010 Plus + AOC 5000) equipado com uma coluna UB-1701 (60 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi hélio com velocidade linear 1,69 cm/s, e as condições de operação foram: temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C, temperatura da coluna 50 °C por 1 min até 270 °C a uma taxa de 5 °C/min, por 5 min e aumentado a 280 °C a uma

taxa de 10 °C/min mantido por mais 10 min. Foi utilizado uma taxa de split (10:1). O GC era equipado com um injetor automático (Shimadzu, AOC 5000), o volume injetado era de 1 μ L. No espectrômetro de massas (EM) foram utilizadas as seguintes temperaturas: temperatura de Ion Source (250 °C), temperatura de interface (250 °C). A faixa de massa monitorada foi de 40 a 400 m/z . O software de gerenciamento utilizado foi o GCMS Solutions da Shimadzu e a biblioteca de compostos foi a NIST08s.

Tabela 12 – Parâmetros de cromatografia gasosa utilizados na Quinta etapa

Parâmetros	GC-FID	GC-MS
Equipamento	Shimadzu GC-2010	Shimadzu GCMS QP2010 Plus
	AOC 20i (injetor aut.)	AOC 5000 (injetor aut.)
Coluna	HP-5	UB-1701
	30 m x 0,25 mm - filme 0,25 μ m	60 m x 0,25 mm - filme 0,25 μ m
GC		
Temp. Injeção	250 °C	250 °C
Gás de arraste	Hélio	Hélio
Rampa de temp.	50 °C por 1 min	50 °C por 1 min
	270 °C a 3 °C/min por 5 min	270 °C a 3 °C/min por 5 min
	300 °C a 20 °C/min por 5 min	280 °C a 10 °C/min por 10 min

3.6 QUINTA etapa

Nessa etapa do trabalho foi desenvolvida uma metodologia focada para extração do composto ativo antioxidante, ácido rosmarínico (AR). A planta (material vegetal seco) e o resíduo (material vegetal seco pós-extração supercrítica) foram submetidos a uma extração com solvente orgânico, e duas técnicas foram avaliadas.

3.6.1 Procedimentos de extração sólido-líquido

Para retirada do AR da matriz vegetal (folhas secas e moída) a extração sólido-líquido foi utilizada. A matriz vegetal sem e com tratamento extrativo (ESC), foi submetida à extração sólido-líquido, onde duas técnicas foram avaliadas, extração em batelada normal (sem agitação) e extração em batelada auxiliada por ultrassom. As mesmas foram realizadas em triplicada, em diferentes temperaturas (30 e 60) °C, com diferentes concentrações de etanol (0, 30, 50, 70 e 100¹) %. As soluções foram preparadas utilizando-se água UltraPura e Etanol absoluto (Carlo Erba, França).

3.6.2 Extração em batelada normal

Uma quantidade de 100 mg de folhas secas de alecrim foram moídas e submetidas a extração, com 10 mL de solvente etanol (0, 30, 50, 70 e 100 %) em água, durante 15 min em um banho termostático, sem agitação. Durante cada extração o sobrenadante era retirado e uma nova alíquota de 10 mL era adicionada para uma segunda extração da mesma amostra. As duas frações eram combinadas e submetidas a centrifugação durante 20 min a 4500 rpm. O sobrenadante era então coletado e filtrado, utilizando-se um filtro seringa de nylon 0,2 µm para HPLC, transferido para um tubo de teste. As extrações foram realizadas a 30 °C e 60°C. Os experimentos estão resumidos na Tabela 13. Esse processo foi aplicado ao material vegetal sem

¹ Etanol absoluto 99,5 %

tratamento (no caso, a planta seca e moída) e com tratamento de ESC (após ESC a 80 bar e 150 bar). Todo o procedimento de extração foi realizado em triplicata, para cada condição.

Tabela 13 – Extração sólido-líquido das folhas de alecrim

Modo	Etanol	Tratamento	Temp. °C	Repetição
Normal	0%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Normal	0%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Normal	0%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Normal	30%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Normal	30%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Normal	30%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Normal	50%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Normal	50%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Normal	50%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Normal	70%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Normal	70%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Normal	70%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Normal	100%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Normal	100%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Normal	100%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata

3.6.3 Extração em batelada auxiliada por ultrassom

Foi realizado o mesmo procedimento (da subseção 3.6.2) de extração e preparação de amostras. Porém foi utilizado um banho termostático com ultrassom (Elma Transsonic TIH20, Figura 25) em modo de operação a 25 kHz, nas temperaturas de 30 °C e 60 °C para cada extração. As condições experimentais estão descritas na Tabela 14.

Após o procedimento de extração as amostras foram em seguida submetidas a análise HPLC para quantificação do AR.

3.6.4 Determinação da concentração ácido rosmarínico via HPLC-Analítico

A separação e identificação do ácido rosmarínico foi obtida com HPLC-Analítico (Shimadzu LC-10AT VP) equipado

Figura 25 – Banho termostático com ultrassom, Elma-Transsonic TI-H-20 (Alemanha).



Tabela 14 – Extração sólido-líquido das folhas de alecrim auxiliada por ultrassom

Modo	Etanol	Tratamento	Temp. °C	Repetição
Ultrassom 25 kHz	0%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	0%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	0%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	30%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	30%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	30%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	50%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	50%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	50%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	70%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	70%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	70%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	100%	sem tratamento	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	100%	após ESC 80 bar	30 e 60	triplicata
Ultrassom 25 kHz	100%	após ESC 150 bar	30 e 60	triplicata

com um *Photodiode Array Detector* (PDA) (Varian Pro Star). Foi utilizado uma coluna de fase-reversa C-18 (Varian Pursuit XRs, 250 mm x 4,16 mm, 5 μ m) e uma pré-coluna C-18 (Varian Pursuit MetaGuard, 15 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Para uma melhor separação e identificação do composto diversas metodologias de diferentes autores foram avaliadas, Tabela 15. Assim uma metodologia foi adaptada para o equipamento em questão, denominado HPLC-1. Os cromatogramas foram monitorados nos comprimentos de onda de (280 e 330) nm.

Tabela 15 – Métodos avaliados no equipamento HPLC 1

Método	1	2	3	4
Equipamento	Shimadzu (LC-10AT) Detector PAD Varian (Modelo 335, LC0812M804))			
Coluna	Varian Pursuit Xrs C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m)			
Pre-coluna	Alltech, C18 5 μ m			
Vol. injeção	20 μ L			
Vazão	1 mL.min ⁻¹			
Solvente A	Água + 0,1% TFA	Água + 0,1% H ₃ PO ₄	Água + 0,1% AcOH	Água + 0,1% H ₃ PO ₄
Solvente B	Acetonitrila	Metanol + 0,1% H ₃ PO ₄	Acetonitrila	Acetonitrila
Condições (B)	0 min - 0% 20 min - 35% 40 min - 70% 45 min - 100%	0 min - 40% 10 min - 50% 15 min - 60% 25 min - 60%	0 min - 70% 8 min - 70% 13 min - 100%	0 min - 17% 35 min - 23% 37 min - 36% 57 min - 56% 59 min - 100%

Fonte: 1-(JAVANMARDI et al., 2002), 2-(WANG, 2004), 3-(TENA et al., 1997), 4-(AREIAS et al., 2000)

Posteriormente um segundo equipamento, outro HPLC-Analítico, foi utilizado (Shimadzu LC-20A), equipado um PAD (Shimadzu SPD-M20A) e um injetor automático (Shimadzu SIL-20AC), denominado HPLC-2. Os métodos utilizados nesse equipamento estão descritos nas Tabelas 16. Esses foram definidos baseados na experiência prévia com o equipamento HPLC-1. Para isso a mesma coluna analítica foi utilizada. Buscando um método de separação com uso de solventes de baixa toxicidade

uma metodologia utilizando etanol (solvente A) foi desenvolvida e aplicada, o que serviu de método de base para o equipamento HPLC-preparativo utilizado em etapa posterior (seção 3.6.5) de separação e recuperação do analito. Todos os solventes foram filtrados antes das análises de HPLC, utilizou-se filtro PTFE 0,2 μm (Pall Filters) para os solventes orgânicos e filtro de Nylon 0,2 μm (Pall Filters) para solução tampão aquosa, foi também utilizada água ultra pura 18.2 M Ω -cm (Elga, Filtro PureLab Ultra), para preparação das soluções.

Tabela 16 – Metodologia utilizada no HPLC 2

Método	1	2
Equipamento	Shimadzu (LC-20A) PAD Shimadzu (SPD-M20A))	
Coluna	Varian Pursuit Xrs C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm)	
Pré-coluna	Varian Pursuit MetaGuard C-18 (15 mm x 4,6 mm, 5 μm)	
Vol. injeção	20 μL	
Vazão	0.4 mL.min ⁻¹	0.3 mL.min ⁻¹
Solvente A	Água + 0,1% H ₃ PO ₄	
Solvente B	Metanol	Etanol
Condições (B)	0 min - 50%	0 min - 30%
	2 min - 50%	5 min - 40%
	25 min - 90%	12 min - 50%
	30 min - 50%	23 min - 60%
		29 min - 70%
		35 min - 30%

3.6.4.1 Preparação da solução padrão e validação do método

Para a escolha do método de separação, uma solução estoque foi preparada com precisão, contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido rosmarínico (Aldrich, 96%), homogeneizados com auxílio de um ultrassom. Foram preparadas diferentes soluções, com os solventes, Metanol, Etanol, Água (Ultra Pura) e Etanol:Água (30:70, v/v). Ainda diferentes metodologias foram avaliadas nesse pro-

cesso para cada tipo de solvente da solução de trabalho. O objetivo dessa análise foi o de avaliar a resposta (tempo de retenção e resolução do pico) do método de separação frente as soluções com diferentes solventes.

Como critério de validação dos métodos foram utilizados, os dados de área e tempo de retenção, onde para cada pico do cromatograma obtido a partir de cinco injeções, foram obtidos os desvios padrão relativo da amostra (coeficiente de variação, C_v).

$$C_v = (\sigma/\bar{X}) \cdot 100 \quad (3.14)$$

sendo, σ o desvio padrão amostral e \bar{X} a média das amostras.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.15a)$$

$$\bar{X} = (X1 + X2 + \dots + Xn - 1 + Xn)/n \quad (3.15b)$$

O critério utilizado foi, C_v máximo de 1,5 % para área e 1,0 % para o tempo de retenção, determinado a partir da equação (3.14). Dessa forma para todas as metodologias testadas, a escolha para utilização da mesma passaram pelos critérios estatísticos de validação.

3.6.4.2 Soluções padrão e curvas de calibração

Para quantificação, o método do padrão externo foi utilizado. Uma curva de calibração para o ácido rosmarínico foi preparada, onde as áreas dos picos dos cromatogramas foram plotadas com a concentrações conhecidas das soluções. Uma equação gerada por um regressão linear foi utilizada para estabelecer a concentração da solução. Uma quantidade de 10 mg de AR foi acuradamente pesada e dissolvida em um frasco de 50 mL com o solvente escolhido (etanol:água, 30:70 v/v) para obter novamente uma solução estoque. Para a curva de calibração, a solução estoque foi diluída para obter uma sequencia de concentrações de (100, 80, 60, 50, 20, 10, 5 e 1) $\mu g/mL$. As áreas geradas dessas soluções foram plotadas com a concentração para estabelecer uma curva de calibração.

A reprodutibilidade da quantidade injetada não é quase um problema em HPLC como é em *Gas Chromatography* (GC). Basicamente são injetados cerca de dez vezes mais amostra (5 a 20 μL), e não existe perdas durante a injeção, uma vez que a amostra não é carregada em um sistema de alta-pressão e temperatura através de um *septum*, como é o caso do GC. Além disso, o loop de injeção foi construído para ter um volume particular (20 μL) que garante a sua reprodutibilidade. Onde essa é maximizada pela injeção de volumes superiores no *loop* com o uso de uma seringa. Desse modo se assegura o seu preenchimento, garantindo que o mesmo volume seja introduzido em cada análise (KENKEL, 2003).

A linearidade foi avaliada em cada equipamento, obtida a partir da absorbância em cada concentração das soluções preparadas para a curva de calibração, dessa forma foram obtidos os valores dos desvios.

$$\text{Desvio}[\%] = (SR - SRS)/SRS \cdot 100 \quad (3.16)$$

sendo, SR a sensibilidade relativa e SRS a sensibilidade relativa padrão.

$$SRS = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (SR) \quad (3.17a)$$

$$SR = \frac{\text{Absorbancia}[AU]}{\text{Concentracao}[\mu\text{g}/\text{mL}]} \quad (3.17b)$$

Sendo como critério de validação desvios não superiores a $\pm 5,0\%$.

3.6.5 Separação e purificação do ácido rosmarínico via HPLC-Preparativo

Para separação do AR em uma ampliação de escala ($500\times$) foi utilizado um HPLC-Preparativo (Varian ProStar Prep HPLC System), que incluem duas bombas (Varian ProStar 210 Pump, pressão max. 410 bar), um detector PDA (Varian ProStar 335 Photo Diode Array Detector), módulo de válvula e coluna (Varian ProStar Column Valve Module CVM 500) com módulo de

interface com computador (Varian ProStar Computer Interface Module), com válvulas de injeção manual com dois *loops*, um de 20 μL (Rheodyne 7725i (*com switch*)) e outro com 10 mL (Rheodyne 3725(i)-038). Foi utilizada uma coluna preparativa de fase-reversa C-18 (Varian Pursuit, 150 mm x 21,2 mm , 5 μm) com uma pré-coluna C-18 (Varian Pursuit GUARD, 30 mm x 21,2 mm , 5 μm). Nesse equipamento foi utilizado também uma coluna analítica de mesmo modelo, C-18 (Varian Pursuit, 150 mm x 4,6 mm , 5 μm), para validação do método no sistema. Os métodos testados nesse equipamento estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17 – Métodos avaliados no equipamento HPLC-Preparativo

Método	1	2
Equipamento	Varian ProStar Dynamax Prep System Detector PAD Varian (ProStar 335)	
Coluna	Varian Pursuit C-18 (150 mm x 21,2 mm , 5 μm)	
Pré-coluna	Varian Pursuit MetaGuard C-18 (30 mm x 21,2 mm , 5 μm)	
Vol. injeção	10 mL	
Vazão	21 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$	
Solvente A	Água + 0,1% TFA	
Solvente B	Metanol	Etanol
Condições (B)	0 min - 40%	0 min - 30%
	25 min - 90%	5 min - 30%
	30 min - 40%	25 min - 90%
	35 min - 40%	30 min - 30%
		35 min - 30%

Com objetivo de implementar um processo de separação com solventes de baixa toxicidade a metodologia de separação com etanol foi desenvolvida e testada na ampliação de escala, da analítica (injeção de 20 μL) para a preparativa (10 mL).

Visando obter o AR separadamente do restante dos compostos foi injetado uma alíquota de 10 mL do extrato (etanol:água, 30:70 v/v) de alecrim, onde diferentes frações foram coletadas durante o processo, baseadas no tempo de retenção. Es-

As frações foram submetidas a análise HPLC-MS (cromatografia líquida com espectro de massa) para identificação dos compostos de cada fração para confirmação do AR.

3.6.5.1 Identificação do ácido rosmarínico por HPLC-MS

Após o procedimento de obtenção das frações de extrato de alecrim por HPLC-Preparativo, as amostras foram submetidas à identificação por HPLC-MS. Para essa análise uma fase móvel similar (seção 3.6.4) foi utilizada, mas ao invés de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) foi utilizado ácido fórmico ($HCOOH$), acidificado até pH 2.5, Tabela 18. A varredura de massa foi realizada entre 50-1500 m/z . Condições de operação do DUIS (Dual Ions Source ESI + APCI) foram otimizadas no início das análises com *autotuning* (LabSolution 5.1, Shimadzu) e um padrão interno, na temperatura de 350°C, vazão do nebulizador em 1,5 mL/min , gás seco a 10 L/min e a voltagem da descarga do feixe de corona a 4.0 kV .

O equipamento utilizado foi um HPLC (Shimadzu LC-20AD) acoplada a um espectrômetro de massa (Shimadzu LC-MS 2020) quadrupolo com modo de ionização duplo (DUIS, ESI + APCI) com mudança polaridade de alta velocidade, acoplado a um detector PDA (Shimadzu SPD-M20A) e um injetor automático (Shimadzu SIL-20AC HT). A identificação do AR foi baseada no espectro de massa do padrão injetado, monitorado tanto em modo (+) quanto (-), e ainda confirmando com os dados da literatura.

Tabela 18 – Metodologia utilizada no HPLC-MS

Equipamento	Shimadzu (LC-20AD) PAD Shimadzu (SPD-M20A)) Espectrômetro de massa Shimadzu (LC-MS 2020)) Injetor Automático Shimadzu (SIL-20AC HT))
Coluna	Varian Pursuit Xrs C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) Varian Pursuit MetaGuard C-18
Pré-coluna	(15 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Vol. injeção	20 μ L
Vazão	0.4 mL.min ⁻¹
Solvente A	Água + 0,1% <i>HCOOH</i>
Solvente B	Metanol
Condições (B)	0 min - 40% 2 min - 40% 25 min - 90% 30 min - 40% 35 min - 40%

3.7 SEXTA etapa

Nessa última etapa do trabalho foram realizadas análises econômicas dos processos estudados. Os custos foram dolarizados (2,36 R\$/US\$) para futuras comparações e publicação. Para o processo de extração e separação dos compostos bioativos do alecrim, foi realizado uma avaliação econômica do custo de manufatura dos produtos resultantes, sendo eles o extrato supercrítico ou extrato supercrítico fracionado (antimicrobiano), extrato hidro-alcoólico (antioxidante) e o ácido rosmarínico (antimicrobiano e antioxidante) como composto purificado.

Desse modo foram avaliados os custos envolvidos no processo de extração e separação dos compostos bioativos de interesse. Os custos avaliados envolvem desde investimentos em equipamentos, custos operacionais e de gestão, aquisição de matérias-primas e seu processamento. As tecnologias envolvidas nesse processamento vão desde a utilização de um planta de extração supercrítica e extração sólido-líquido em batelada, processos de filtração, separação, fracionamento e purificação.

Para cumprir com a avaliação do custo de manufatura dos diferentes produtos, duas simulações foram realizadas, uma para o custo do extrato supercrítico e outra para o ácido rosmarínico.

Um avaliação otimizada foi proposta por [Rosa e Meireles \(2005\)](#), para determinação do custo de manufatura (*Cost of Manufacturing*) (COM) de extratos utilizando extração com fluido supercrítico. Essa avaliação foi baseada em uma metodologia desenvolvida por [Turton et al. \(1998\)](#) que considera o custo de manufatura como uma função do que ele chama de, custos diretos (que dependem diretamente da produção e suas quantidades) e indiretos, como os custos fixos (envolvendo a depreciação dos equipamentos, taxas e seguros) e ainda os custos gerais (dos quais fazem parte os custos administrativos dos diferentes setores, como o de vendas, pesquisa e desenvolvimento) ([TURTON; BAILIE; WHITING, 2009](#)).

[Pereira e Meireles \(2007\)](#) realizaram uma análise econômica do óleo essencial de alecrim, funcho e anis obtido por extração com fluido supercrítico. Para essa avaliação as condições

operatórias avaliadas foram de 40 °C e 300 bar (sendo 5,0 % o rendimento do extrato). O custo de manufatura do óleo essencial estimado, por ESC, como sendo *Cost Class Five* (Custo de Classe 5) (ACCEI, 2003), que considera um nível baixo de definição do projeto. Não foram contabilizados na análise, a lucratividade e a taxa de retorno. Os mesmo parâmetros experimentais obtidos em escala laboratorial foram utilizados na ampliação da escala, como tamanho de partícula e densidade aparente do leito (358 kg/m^3), a razão de massa de planta e vazão de solvente foi mantida constante.

3.7.1 Avaliação econômica do processo de extração supercrítica

Com base em dados da literatura essa análise foi realizada com a estimativa dos vários custos diretos (pertinentes ao processo de extração supercrítica) acrescido dos custos indiretos, como segue.

3.7.1.1 Determinação do custo de manufatura (COM)

Para determinação dos custos foram obtidos alguns valores de bibliografia pertinente (referenciados) e outros valores foram baseados em valores de mercado atual, obtidos por consulta direta. A composição do COM é feita com base nos custos diretos e indiretos. Os custos diretos compreendem os custos fixos representados pela compra dos equipamentos envolvidos no processo, e os custos operacionais dos quais fazem parte as matérias-primas, a mão-de-obra, fornecimento de CO_2 e utilidades. Para os custos indiretos fazem parte as despesas com taxas e impostos, depreciação, marketing, e outros custos administrativos.

3.7.1.2 Custos indiretos

A produção anual não é dependente dos custos indiretos, listados na Tabela 19, que compreendem uma porcentagem do investimento inicial (F_{CI}). Porém outros custos devem ser relacionados, como os custos gerais, de vendas, marketing, pesquisa

e desenvolvimento, bem como taxas administrativas, sendo uma quantidade aproximada de 5 % do total investido (FCI) (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2002), totalizando 19 % do investimento inicial.

Tabela 19 – Quantidades aproximadas dos custos indiretos

Tipo de custo	% do Investimento Inicial
Seguro	1 % <i>FCI</i>
Depreciação	10 % <i>FCI</i>
Manutenção	2 % <i>FCI</i>
Taxas e impostos	1 % <i>FCI</i>

3.7.1.3 Investimento inicial (FCI)

O investimento inicial se refere a aquisição de uma unidade de extração supercrítica, onde essa unidade compreende todos os equipamentos necessários para a operação. Dessa forma uma unidade ESC possui basicamente, bombas, trocadores de calor, extratores e separadores (vasos de pressão), compressor, tubulações, válvulas e acessórios. Para o investimento inicial foram desconsiderados os custos iniciais de solvente, co-solvente e matéria-prima para iniciar a parte operacional.

Normalmente uma unidade de extração supercrítica é composta de dois ou mais extratores, o qual facilita o modo operatório do processo em semi-batelada, onde enquanto um extrator é utilizado o outro é recarregado e assim sucessivamente, evitando-se nesse caso uma parada total da unidade de extração.

Os custos das unidades de extração supercríticas utilizados para essa análise estão indicados na Tabela 20, adaptado de Prado (2009). Segundo o autor os custos foram determinados pela regra *six-tenth* (TURTON; BAILIE; WHITING, 2009), onde são estimados quando é conhecida a capacidade e o preço de um equipamento similar (PRADO, 2009).

Tabela 20 – Custo da unidade de ESC no mercado norte americano e chinês.

Capacidade dos Extratores [litros]	Custo da unidade Americana [US\$]	Custo da unidade Chinesa [US\$]
5	200.000,00	100.000,00
50	500.000,00	300.000,00
100	750.000,00	450.000,00
200	1.125.000,00	650.000,00
300	1.500.000,00	850.000,00
400	1.750.000,00	1.000.000,00
500	2.000.000,00	1.150.000,00
1000	3.000.000,00	2.000.000,00

Fonte: Adaptado de [Prado \(2009\)](#).

3.7.1.4 Custos diretos

Segundo Shariaty-Niassar *et al.* (2009) os custos diretos em uma unidade ESC cobrem cerca de 30 % a 70 % das despesas de produção, onde esses custos são diretamente proporcionais ao custo da matéria prima (*RM*C), mão-de-obra (*LC*) e utilidades (*UC*) ([SHARIATY-NIASSAR et al., 2009](#)).

3.7.1.5 Custo operacional (LC)

O custo operacional envolve a mão-de-obra utilizada na planta de extração e foram considerados dois operadores em cada turno de trabalho, nos três turnos diários, durante 330 dias por ano. Foi estimado o valor de 3,80 US\$/h, com base no valor da mão-de-obra local da região de Florianópolis-SC, considerando um total de 7.920 h operacionais no ano ([ROSA; MEIRELES, 2005](#)).

3.7.1.6 Custo de utilidades (UC)

O custo de utilidades, são os custos envolvidos na operação das utilidades da planta industrial, envolvendo o funcionamento dos equipamentos e seus gastos energéticos. No presente caso foram considerados os gastos energéticos no ciclo do CO₂ puro com auxílio de um diagrama de temperatura-entropia, onde as etapas de compressão, expansão e re-compressão foram estimadas

na extração e separação do extrato (BRUNNER, 1994; PRADO, 2009).

3.7.1.7 Custo da matéria-prima (RMC)

O custo da matéria-prima se refere à aquisição do material vegetal (alecrim), solventes (CO_2 e etanol), transporte e pré-processamento. Para efeito dessa avaliação os valores (V_{mp}) utilizados estão apresentados na Tabela 21, e para a matriz vegetal já estão incluídos os custos de secagem e transporte.

Tabela 21 – Custos das matérias-primas

Matéria-prima	V_{mp} (US\$/kg)	Fonte
Alecrim	5,90	(SANTOSFLORA, 2012)
Alecrim importado	3,00	(RACINEX, 2010)
CO_2	0,15	(ROSA; MEIRELES, 2005)
Etanol	0,97	(ICIS, 2008)

A perda de CO_2 considerada no processo foi de 2%, conforme já referenciado por alguns autores (PEREIRA; MEIRELES, 2007; ROSA; MEIRELES, 2005).

3.7.1.8 Custo do tratamento de resíduos (WTC)

No processo de extração supercrítica de uma matriz vegetal o único resíduo gerado é a matriz vegetal utilizada. Podendo essa matriz vegetal ser reincorporada no solo como adubo (material orgânico seco), utilizada como insumo para geração de calor em caldeira à queima de biomassa ou ainda ser reutilizada em outro processo. Nesse trabalho o resíduo orgânico foi utilizado como matéria-prima para extração de outros compostos bioativos, o extrato hidro-alcoólico para separação do ácido rosmarínico. Para tanto o custo de tratamento de resíduo foi desconsiderado na estimativa do custo de manufatura do extrato, sendo ele não mais um resíduo e sim um subproduto.

3.7.2 Avaliação econômica do processo de separação

A separação de compostos vem sendo desenvolvida por décadas, e o uso de processos cromatográficos se deu desde 1950, quando em 1960 sofreu um grande salto no seu desenvolvimento, quando a empresa UOP (Process Division, EUA) introduziu no mercado um novo processo chamado de, leito móvel simulado, **SMB**, o *Sorbex*.

O processo de separação cromatográfica em escala industrial tem objetivos diferentes da escala analítica. Segundo Pynnönem (1998) um processo cromatográfico possui muitos graus de liberdade quando da sua escolha no planejamento do processo de separação. Fatores que não são importantes em escala analítica são de extrema importância no custo do processo de separação em escala industrial, tais como, alta solubilidade do soluto no eluente, tamanho da coluna, temperatura de operação, trabalho de empacotamento da coluna, tamanho de partículas, recuperação do solvente e escala do equipamento. O uso de tamanhos de partículas na faixa de (50-200) μm , considerado grande, quando comparado as de escala analítica (5 μm), empacotado em colunas maiores e operando em modo contínuo, em sistema SMB, pode reduzir o custo do processo de separação em ordens de magnitude (PYNNONEN, 1998). Ainda segundo o autor, a visão analítica de um processo de separação o qual visa se obter picos bem definidos com alta pureza e resolução não se aplicam a um modelo econômico do processo industrial. Sendo a chave para se libertar de um alto custo é a mudança na maneira de se planejar o processo. Nos processos de cromatografia por eluição (processos normais em batelada, como em HPLC-analitico) a alta pureza de um composto e sua recuperação não pode ser obtida com baixa resolução de pico. Porém, em um processo contínuo, como no caso do SMB isso seria possível, o qual já se tornou uma realidade há algum tempo.

Para uma avaliação global do custos de um processo de separação, quatro são os fatores de maior influência. São eles, a coluna de separação e suas condições operacionais, o tamanho de

partícula da fase estacionária utilizada, escala e o grau de otimização econômica do processo. Esses aspectos são importantes tanto em um sistema de eluição (cromatografia líquida em batelada - HPLC) como em um sistema SMB. Se apenas um desses fatores é otimizado é improvável que o custo seja minimizado. Para apresentar um visão mais geral do impacto de suas escolhas serão descritos, brevemente, as principais características de cada um deles.

1. Tamanho de partícula

- Perda de carga

- Custo do equipamento

- Resolução

- Procedimento de empacotamento da coluna

2. Coluna de separação e condições operacionais

- Dimensões da coluna (altura e diâmetro)

- Vazão de solvente

- Alimentação (pureza e concentração)

- Distribuição (sistema de coleta das frações)

3. Economias de escala

- Investimento (equipamentos)

- Custo operacional

4. Otimização econômica

- Integração do processo

- Compra de solventes *vs* reciclo

O tamanho de partícula influencia na perda de carga de um sistema onde um fluido passa através de um leito sólido particulado. Para os casos de um fluxo laminar (baixo número de Reynolds) como é encontrado em cromatografia líquida, a perda

de carga pode ser determinada pela equação de Leva, reduzida a equação de Blake-Kozeny, como segue:

$$\Delta P = \frac{150\nu_0 L \mu (1 - \varepsilon)^2}{D_p^2 \varepsilon^3} \quad (3.18)$$

onde ΔP é a perda de carga na coluna, V_0 a velocidade superficial, L comprimento da coluna, μ é a viscosidade do fluido, ε é a porosidade do leito na coluna e D_p é o diâmetro de partícula.

A partir da equação (3.18) podemos concluir que com a redução da viscosidade do fluido (aumento da temperatura), redução do comprimento da coluna, baixa vazão e aumento do diâmetro de partículas podemos reduzir drasticamente a perda de carga na coluna. Porém a cada escolha implica em uma mudança na resposta do processo, o que nos leva a uma limitação em cada um dos parâmetros a serem alterados. O aumento da temperatura implica em perda de seletividade do processo ou até mesmo degradação dos compostos a serem separados. A redução do comprimento da coluna é geralmente utilizado na prática. Baixas vazões implicariam em redução da produtividade. Aumento do tamanho de partícula (D_p) resultaria em um aumento da altura equivalente do prato teórico (HETP) e a uma redução da resolução do pico.

Uma correlação entre o tamanho de partícula e o seu custo foi determinada por Pynnonen (1998), para diversas fases estacionárias, incluindo fases reversas C-18 (utilizada na separação do AR), para uma faixa de diâmetro de (5 a 900) μm , avaliada nos períodos entre 1972 e 1998. A equação utilizada para obtenção do custo ($US\$/g$) da fase estacionária segue como:

$$Custo(US\$/g) = 3623(D_p)^{-1,675} \quad (3.19)$$

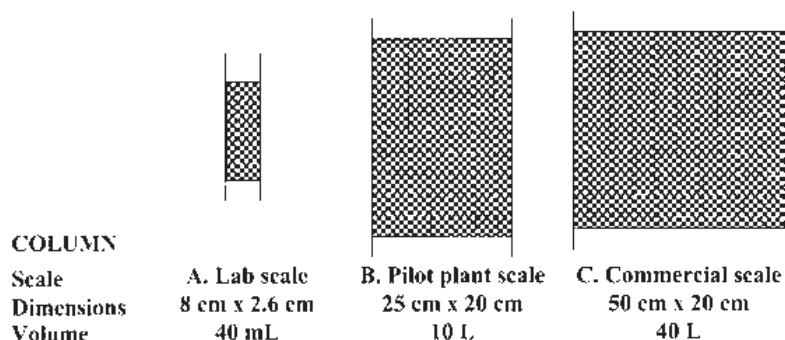
Equipamentos para uso em processo de alta pressão custam mais do que aqueles para pressões normais a baixas. Isso geralmente é mais evidente em processos de larga escala. O equipamento de maior impacto no custo de aquisição de uma unidade são as suas colunas. Dessa forma os custos de investimento inicial foram baseados utilizando a mesma regra *six-tenth*.

Tabela 22 – Custo das unidades de separação cromatográficas. Adaptado de (PYNNONEN, 1998).

Capacidade da unidade	Custo da Unidade [US\$]
Analítica	100.000,00
Piloto	500.000,00
Comercial	1.000.000,00
SMB	1.400.000,00

A performance de uma coluna cromatográfica depende de um variedade de fatores operacionais e de projeto, como já apresentado. De modo a obter um aumento de escala bem sucedido foi mantida a cinética (tamanho de partícula, porosidade, química da fase estacionaria, temperatura, fase móvel) e a dinâmica (altura do leito, velocidade do fluxo, densidade da coluna empacotada), equivalente, entre as colunas utilizadas em escala laboratorial com as das plantas avaliadas (PEPER; JOHANNSEN; BRUNNER, 2007; TOUMI et al., 2007; KASPEREIT et al., 2005; JUPKE; EPPING; SCHMIDT-TRAUB, 2002; PYNNONEN, 1998). Esses objetivos foram alcançados utilizando, na avaliação, fase estacionaria e fase móvel idênticas, com as mesmas, altura de leito, velocidade linear do fluxo, composição química da fase estacionaria, condições de alimentação e gradientes. Para lidar com o aumento do volume de injeção em escala piloto, o procedimento mais comumente utilizado é o aumento do volume da coluna, com o aumento do seu diâmetro. Isso mantém o tempo de residência do produto constante e evita possíveis problemas de estabilidade do produto final (quando for o caso) (RATHORE; VELAYUDHAN, 2003). A Figura 26 mostra um esquema com três tamanhos diferentes de coluna que são comumente utilizadas em escala laboratorial, piloto e comercial. Assim para essa análise econômica foram levantados vários cenários de operação, baseado nos resultados obtidos na escala analítica. Dessa forma tentou-se manter uma previsão dos custos envolvidos no conjuntos dos processos de maneira simples e básica, para um entendimento global da separação do ácido-rosmarínico. Na avaliação econômica da separação do AR, foram selecionados quatro escalas de processo, sendo elas, ana-

Figura 26 – Exemplo de três diferentes escalas de colunas utilizadas em desenvolvimento de processos de separação.



Fonte: Rathore e Velayudhan (2003)

lítica, piloto e comercial, referentes ao modo de operação em HPLC-batelada com injeção pulsada (injeção sequencial a cada intervalo de tempo de 15 *min*) e ainda modo de operação SMB. Na Tabela 23 estão referenciadas as escalas, volumes das colunas utilizadas, número de colunas utilizadas no processo, número de trocas da fase estacionária por ano e o diâmetro de partícula. Como base para as escalas foi proposta como sendo a escala piloto 100× a escala analítica, a comercial 10.000×, e em modo SMB aproximadamente 21.000×.

Tabela 23 – Colunas referentes a cada uma das escalas dos cenários avaliados.

	volume da coluna (mL)	nº de colunas	trocas (/ano)	D_p (μm)
ANALÍTICA	14,3	3	2	5
PILOTO	4300	1	1	10
COMERCIAL	71500	2	1	15
SMB	145000	8	1	320

Na Tabela 24 são apresentados os custos da fase estacionária C_{18} calculada com base na equação (3.19), em $US\$/g$ e seu respectivo custo anualizado.

Tabela 24 – Custos da fase estacionária (C_{18}) para cada uma das escalas.

	D_p (μm)	US\$/g	US\$/ano
ANALÍTICA	5	244,51	11.244,64
PILOTO	10	76,57	176.482,47
COMERCIAL	15	38,83	2.975.886,08
SMB	320	0,23	143.405,20

Para a determinação dos custos diretos e indiretos foi utilizada a mesma metodologia utilizada na seção 3.7.2. E o custo de manufatura do AR por separação cromatográfica foi estimado com base em metodologia proposta por Turton (2012). Dessa forma o COM do AR foi calculado como:

$$COM = 0,180 \cdot FCI + 2,73 \cdot LC + 1,23 \cdot (RMC + WTC + UC) \quad (3.20)$$

onde FCI é o investimento inicial, LC é o custo operacional, RMC é o custo da matéria-prima, WTC é o custo do tratamento de resíduos e UC é o custo de utilidades (TURTON et al., 2012).

3.7.2.1 Custos diretos

A maioria dos processos de separação envolvendo cromatografia possuem seus maiores custos identificados como, custos operacionais, fase estacionária, empacotamento de colunas, custos de bombeamento e evaporação de solventes (VANNESTE et al., 2011). Para os eluentes apenas o etanol foi considerado no custo de manufatura, e a água não foi contabilizada.

O custo da fase estacionária foi estimado pela equação (3.19), os custos de bombeamento foram estimados com base no consumo elétrico dos motores elétricos das bombas para cada uma das unidades de separação. O custo de evaporação de solventes foi baseado no consumo energético de um caldeira, para uma determinada vazão de solvente, aplicada a cada unidade somado ao custo de concentração do extrato, necessário antes de injeção no sistema de separação. Para concentrar o extrato foi estimado o custo energético (kg de vapor) em sistema de evaporadores de múltiplo efeito, considerando três efeitos. O custo do

kg de vapor foi estimado com base na demanda de biomassa ou óleo combustível para se obter a quantidade de vapor necessária para suprir cada processo.

3.7.2.2 Custo operacional (LC)

O custo operacional envolve a mão-de-obra utilizada na unidade de separação, embora normalmente esses tipos de unidades sejam altamente automatizadas a necessidade de um mão-de-obra especializada faz-se necessária no monitoramento durante um período do processamento. Dessa forma foi considerado um operador em cada turno de trabalho, nos três turnos diários, durante 330 dias por ano e um especialista durante dois turnos diários. Foi estimado um valor de 3,80 *US\$/h*, considerando num total de 7.920 *h* operacionais no ano, para os operadores e de 12,00 *US\$/h* para o técnico especialista em um total de 5.280 *h* anuais. Para cada uma das unidades segue na Tabela 25 o perfil operacional estimado. Foi considerado aqui somente o pessoal necessário para suprir a demanda do processo de separação. Os outros sub-processos (caldeira, evaporadores, centrífuga, manuseio e transporte) da unidade não foram considerados.

Tabela 25 – Número de pessoal para operação de cada unidade.

Capacidade da unidade	Pessoal	
	[operadores]	[técnico]
Analítica	-	1
Piloto	1	1
Comercial	2	1
SMB	2	1

3.7.2.3 Custo de utilidades (UC)

O custo das utilidades, são os custos envolvidos na operação dos equipamentos da planta industrial, envolvendo os gastos energéticos no tempo de funcionamento (SETHI; WIESNER, 2000). Foi determinado o consumo energético de bombas comerciais com capacidades (vazão e pressão) semelhantes às requeridas por cada

unidade no período total de seu funcionamento, além de uma centrífuga e compressores, e dessa forma estimado o custo com base no valor da energia elétrica na região.

3.7.2.4 Custo da matéria-prima (RMC)

O custo da matéria-prima se refere à aquisição do material vegetal (alecrim), porém o mesmo é obtido como resíduo da extração supercrítica e não foi adicionado ao custo de manufatura.

3.7.2.5 Custo do tratamento de resíduos (WTC)

No processo de separação por cromatografia os resíduos gerados são os solventes e a própria matriz vegetal utilizada para obtenção dos compostos a serem separados. A matriz vegetal foi reintegrada no processo, após um processo de centrifugação, gerando energia, na alimentação da caldeira, utilizada para evaporar e recuperar os solventes. Dessa forma os custos de tratamentos de resíduos foram os do processo de recuperação de solvente por evaporação.

4 Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos em cada uma das etapas do trabalho de pesquisa.

4.1 PRIMEIRA etapa

Nessa primeira etapa foi caracterizado o leito de extração e as unidades extrativas, determinada a solubilidade experimental do extrato de alecrim em CO₂ supercrítico sob regime de vazão constante, ainda, foi estudada a estrutura da planta e a localização do seu óleo essencial. Foram realizados experimentos de extração supercrítica e hidrodestilação e comparado suas composições por cromatografia gasosa. Essa etapa também visou o acúmulo de extrato para utilização em posteriores experimentos para medida de atividade antimicrobiana.

4.1.1 Caracterização da matéria-prima (leito de extração)

Após o processo de secagem foi realizada a separação granulométrica com uso de peneiras (mesh 65 e 80 - SFE-I e II, mesh 40 e 70 - SFE-III) e posteriormente determinação da densidade via picnometria de gás hélio. As características do leito de extração estão demonstradas na Tabela 26.

Tabela 26 – Caracterização do leito de extração

	SFE-I	SFE-II	SFE-III
Densidade, $\rho_s [kg/m^3]$	1225	1225	1225
Densidade aparente, $\rho_a [kg/m^3]$	$392,00 \pm 1,45$	$391,70 \pm 1,13$	$353,50 \pm 0,87$
Porosidade, ε	0,68	0,68	0,71
Altura, H [m]	0,50	0,13	0,30
Diâmetro, d [m]	0,021	0,010	0,020
H/d	23,8	13	15

De forma a caracterizar a matriz vegetal e obter informações a respeito da localização do óleo na planta, uma microscopia eletrônica de varredura foi realizada no alecrim. As imagens obtidas foram coloridas via software após a sua aquisição, de forma a facilitar a visualização dos tricomas glandulares onde se encontra o óleo armazenado na planta. Foram obtidas imagens da secção transversal da folha de alecrim, antes e após o tratamento extrativo com CO₂ supercrítico. Na Figura 27 é apresentada a folha de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) com um corte em sua secção transversal, na parte inferior da folha pode-se observar um sulco bem característico. Nessa região da folha, chamada de abaxial, parte inferior, observam-se as estruturas do alecrim, com filamentos, e em sua superfície, bem característico os tricomas glandulares (forma esférica) onde o óleo é localizado. Na

Figura 27 – Alecrim seco, corte da secção transversal da folha, imagem obtida com MEV. Tricomas glandulares peltados (PT) juntamente com tricomas não-glandulares (NT) localizados na abaxial da folha.

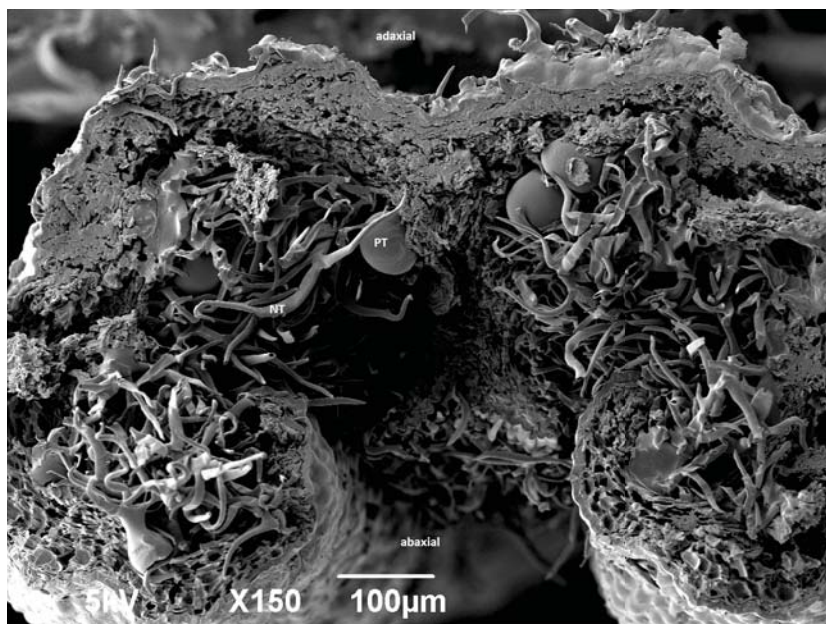
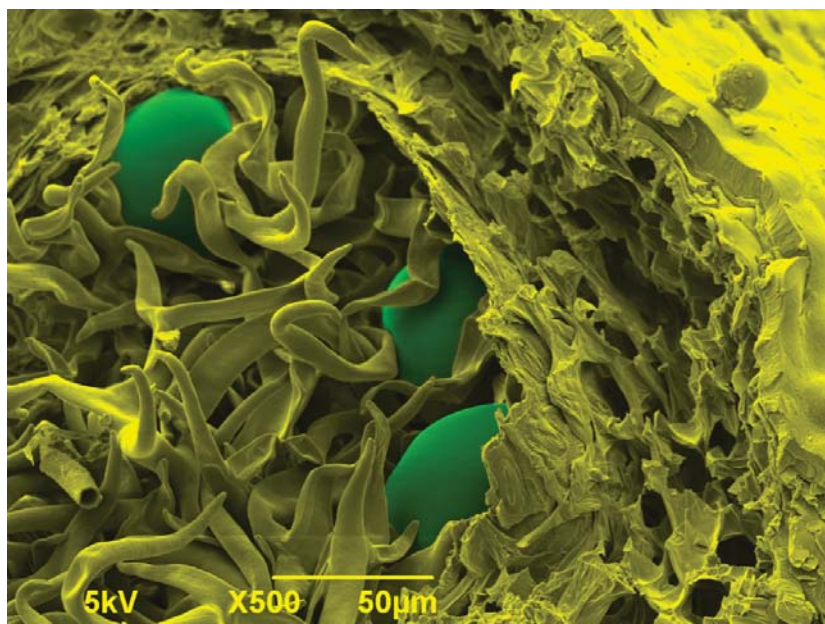


Figura 28 observa-se com detalhe a região dos tricomas glandula-

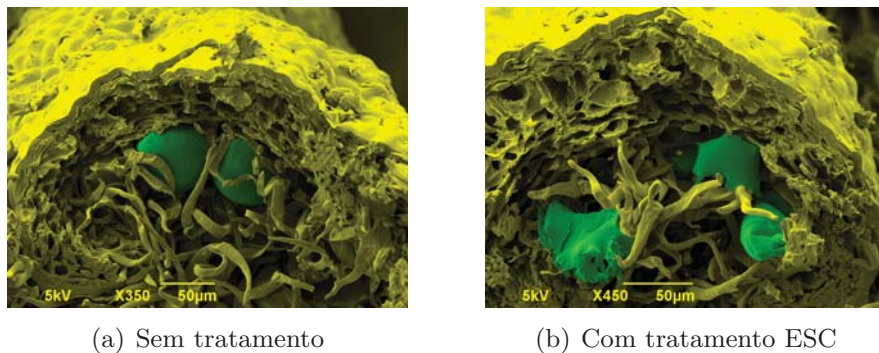
res (em verde escuro) entre os filamentos estruturais do alecrim. Uma comparação entre as folhas de alecrim antes (a) e após (b)

Figura 28 – Alecrim seco, corte da secção transversal da folha, detalhe na região de localização dos tricomas glandulares peltados (verde escuro), imagem obtida com MEV e colorido via software.



o tratamento extrativo com CO_2 está demonstrada na Figura 29, onde pode-se observar os tricomas rompidos (destruídos) após o procedimento de extração supercrítica. O diâmetro médio dos tricomas varia em torno de (45 a 60) μm , para a matriz vegetal estudada. Com exceção dos tricomas, nenhuma outra estrutura, aparentemente, foi rompida ou destruída com a aplicação do procedimento de extração com CO_2 (150 bar e 35 °C, na unidade SFE-III). Visto que os tricomas apresentam um diâmetro relativamente grande, seria possível reduzir a granulometria da planta suficientemente a fim de expor todo o óleo ao solvente. O que torna o procedimento de extração somente um problema de escoamento do solvente por entre as áreas de óleo disponível no leito poroso, para o presente sistema.

Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura, MEV, dos tricomas glandulares peltados do alecrim, sem tratamento e após tratamento extrativo com CO₂ supercrítico.



4.1.2 Extração supercrítica de alecrim

Os experimentos foram realizados em batelada, nas unidades de extração SFE-I, II e III. As variáveis controladas na unidade SFE-I foram pressão e temperatura e as variáveis medidas foram vazão de CO₂ e massa de óleo. Para a unidade de extração SFE-II as variáveis controladas foram pressão, temperatura, vazão de CO₂, co-solvente e eluente e as variáveis medidas foram massa de óleo e absorbância a 254 nm. Na unidade SFE-III as variáveis controladas foram pressão (extrator e separadores), temperatura (extrator e separadores) e as variáveis medidas foram vazão de CO₂ e massa de óleo. Os dados de extração da unidade SFE-I estão mostrados na Tabela 27, onde para os experimentos repetidos com a mesma condição experimental, no caso de 80 bar e 35 °C ($1,35 \pm 0,24$), o rendimento apresentou um desvio padrão de 18 %, a 100 bar e 35 °C ($1,48 \pm 0,21$) este desvio padrão foi de 14 % e para 120 bar e 35 °C ($2,34 \pm 0,16$) foi de 7 % o desvio padrão. Como a planta piloto de extração SFE-I não possuía uma bomba com controle de vazão, a quantidade de CO₂ utilizada foi medida e essa variou em cada experimento. Vale salientar que diferentes quantidades de massa de solvente foram utilizadas a cada experimento.

O principal objetivo desse experimento foi o de determinar

Tabela 27 – Condições de extração - SFE-I - alecrim.

Pressão	Temperatura	Massa total de CO ₂	Densidade do CO ₂	Rendimento
<i>bar</i>	°C	<i>g</i>	<i>kg/m³</i>	%
80	35	336	416,5	1,60
80	35	137	416,5	1,48
80	35	238	416,5	1,26
80	35	198	416,5	1,06
100	35	230	649,4	1,36
100	35	203	649,4	1,75
100	35	217	649,4	1,29
100	35	278	649,4	1,54
120	35	214	719,2	2,45
120	35	299	719,2	2,26
120	35	296	719,2	2,50
120	35	256	719,2	2,15

a melhor condição de extração para esse equipamento, em matéria de rendimento e composição, visando acumular extrato. O extrato acumulado foi avaliado frente a alguns microrganismos em testes *in-vitro* e na aplicação em presunto cozido embalado a vácuo, conforme citado em materiais e métodos. As extrações a 120 *bar* e 35 °C apresentaram o melhor rendimento frente às outras condições testadas, devido a maior densidade do solvente. Pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) as extrações (80 e 100) *bar* não apresentaram diferença estatística no rendimento entre si, sendo a 120 *bar* diferente de ambas, Tabela 28. Dessa forma os extratos acumulados nas condições de 120 *bar* e 35 °C foram utilizados nos ensaios das medidas de atividade antimicrobiana.

Tabela 28 – ANOVA, extração SFE-I 35 °C

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p($\alpha=0.05$)
Entre Tratamentos	2,3058	2	1,1529	27,39926	0,000149
Devido ao erro (resíduos)	0,3787	9	0,0421		
Total	2,6845	11			

A caracterização desses extratos foi realizada via CG-MS para identificação dos compostos e posteriormente via GC-FID para qualificação dos extratos em termos de área absoluta de pico, Tabela 32.

Com a utilização da unidade SFE-II foi possível obter dados da solubilidade experimental do extrato de alecrim em CO₂ supercrítico à 150 bar e 35 °C, onde diferentes condições de vazão foram utilizadas. Essa técnica permitiu avaliar a hipótese de que um maior tempo de contato entre o CO₂ e o extrato serviria para elevar sua concentração na fase solvente, até uma possível concentração de saturação nas condições experimentais. Assim foram realizadas extrações, com a mesma massa de vegetal (0,004 kg), tamanho médio de partícula 0,212 mm, em triplicata para uma mesma vazão. As vazões utilizadas variaram de (0,99 a 0,18) mL/min. Na Tabela 29 pode-se observar o aumento da solubilidade experimental a medida que a vazão de CO₂ foi sendo reduzida, de 0,99 mL/min até 0,45 mL/min, o que sugere que um maior tempo de contato entre as fases seria suficiente para elevar a concentração de soluto no solvente. Na vazão de 0,18 mL/min observou-se um decréscimo da solubilidade experimental e onde o desvio padrão da mesma aumentou cerca de 3x comparado aos outros experimentos. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a quantidade coletada por unidade de tempo era muito pequena, sendo suscetível a erros de medida, e possíveis perdas em seu respectivo frasco no momento da coleta. Lembrando que nessa unidade as coletas eram realizadas de modo contínuo diretamente no frasco, sem o uso de vaso coletor. A medida da massa era realizada em intervalos definidos de tempo. A solubilidade experimental foi obtida graficamente, durante a etapa de extração constante (taxa de extração constante), pela declividade da curva (massa de óleo *vs* massa de solvente) (SOVOVÁ, 2005).

Tabela 29 – Condições de extração - SFE-II, variando a vazão.

Pressão bar	Temperatura °C	Vazão de CO ₂ ml/min [$\times 10^{-5}$ kg/s]	Solubilidade exp. $y^*(\times 10^3)$
150	35	0,99 [1,77]	2,09±0,13
150	35	0,90 [1,62]	2,15±0,06
150	35	0,54 [0,97]	2,26±0,26
150	35	0,45 [0,80]	2,76±0,25
150	35	0,18 [0,32]	1,96±0,86

Para determinação de uma cinética de extração sob regime

de vazão constante, as curvas de extração foram obtidas na unidade SFE-II, Figura 30. A vazão de CO₂ utilizada foi de 1,80 mL/min. Observa-se um aumento no rendimento em função da pressão para ambas as temperaturas testadas (35 e 55) °C, isso se deve a redução da distância média entre as moléculas, aumentando as interações soluto/solvente (CARVALHO et al., 2005). Observa-se que para a pressão de 150 bar, o maior rendimento foi obtido na temperatura de 35 °C, enquanto para a pressão de 250 bar, o maior rendimento obtido foi a 55 °C. Assim para altas pressões ou aquelas acima de 150 bar a pressão de vapor dos compostos predomina sobre o efeito da densidade. Resultados similares foram obtidos por Carvalho et al. (2005).

Tabela 30 – Condições de extração - SFE-II.

Pressão bar	Temperatura °C	Vazão de CO ₂ ml/min [$\times 10^{-5}$ kg/s]	ρ_{CO_2} kg/m ³	Rendimento %
150	35	1,8 [3,23]	790,8	3,13
150	55	1,8 [3,23]	609,3	2,81
250	35	1,8 [3,23]	913,1	3,75
250	55	1,8 [3,23]	802,9	4,31

4.1.3 Extração de alecrim por hidrodestilação

Cerca de 300 g de amostra seca (alecrim moído, brasileiro) foi submetido a hidrodestilação, com utilização de um aparato tipo Clevenger. Os dados de extração estão mostrados na Tabela 31, e a caracterização do óleo essencial do hidrodestilado de alecrim (brasileiro) está apresentado na Tabela 32. Os rendimentos obtidos na hidrodestilação foram inferiores aos obtidos na extração supercrítica e o desvio padrão dos ensaios foi de 7 %. A diferença no rendimento é função de que a ESC extrai outros compostos além daqueles presentes no óleo essencial, como as ceras cuticulares.

Figura 30 – Curvas de extração de alecrim, obtidas na unidade SFE-II, com vazão constante 1,8 mL/min, (○) 150 bar e 35 °C, (△) 150 bar e 55 °C, (□) 250 bar e 35 °C, (◇) 250 bar e 55 °C.

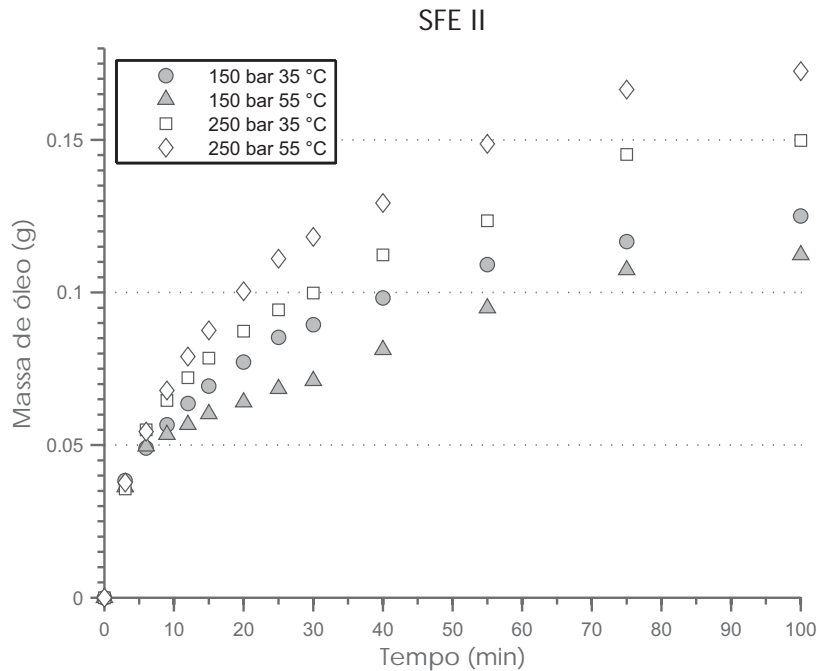


Tabela 31 – Hidrodestilação - alecrim.

Extração nº	Rendimento (%)
1	0,913
2	0,856
3	0,770
4	0,959
5	0,820
6	0,808
7	0,813
média±desvio p.	0,848±0,066

4.1.4 Caracterização dos extratos e do óleo essencial

A caracterização dos extratos supercríticos e do óleo essencial (hidrodestilado, HD) foi realizada via GC-MS para identificação dos compostos e posteriormente via GC-FID para qualificação dos extratos em termos de área absoluta de pico, Tabela 32. A comparação foi realizada somente comparando os compostos com mesmo tempo de retenção em relação à sua área absoluta. Observa-se que o óleo essencial (hidrodestilado), segundo o cromatograma (GC-FID), apresentou uma maior quantidade de α -pineno (12 %) quando comparado aos extratos supercríticos (3 %). Pode-se observar também que os extratos de *Rosmarinus officinalis* provenientes do Brasil, testados nesse trabalho, apresentam uma grande quantidade de canfora (40 %), quando comparado ao óleo essencial e extratos dessa planta, cultivada em outros países (CELIK TAS et al., 2007; BOUSBIA et al., 2009). Dessa forma, os principais constituintes encontrados nas amostras, foram o α -pineno (3-11 %), β -myrceno (6-2 %), 1,8-cineol (6-12 %), linanol (1-2 %), canfora (39-40 %), borneol (1-3 %), α -terpineol (2-4 %), verbenona (7-15 %) e o β -cariofileno (6-9 %). A porcentagem aqui demonstrada se refere à área do composto normalizada com a área total dos compostos identificados no cromatograma, e foi utilizado o mesmo número para as análises em comparação. Pode-se observar que os extratos supercríticos (100 e 120) bar apresentaram uma maior quantidade de sesquiterpenos quando comparados ao óleo essencial obtido por hidrodestilação, isso se deve ao método de extração utilizado, e suas condições.

Observou-se um aumento na área de pico da canfora e verbenona nos cromatogramas, com o aumento da pressão de extração a temperatura de 35 °C. Sendo os perfis cromatográficos das amostras nas condições testadas muito similares.

Muitos autores utilizam a área porcentual do pico em relação a área total do cromatograma, técnica de avaliação muito utilizada atualmente, porém alguns cuidados devem ser tomados para evitar que tal metodologia leve a interpretações incorretas nas análises cromatográficas.

Tabela 32 – Caracterização cromatográfica (GC-FID) dos extratos (SFE-I) e hidrodestilado de alecrim (HD), expresso em área absoluta e área % total dos compostos detectados.

Composto	80 bar 35°C	100 bar 35°C	120 bar 35°C	HD
Monoterpenos				
α -pineno	288.944	610.513	687.015	2.519.330
canfeno	109.224	223.795	258.337	875.774
β -pineno	144.647	306.784	332.888	258.087
β -myrceno	479.683	1.126.231	1.338.552	673.572
para-cymeno	24.034	44.547	58.196	175.967
limoneno	156.325	350.059	383.573	440.444
1,8-cineol	1.217.930	2.070.743	2.395.675	1.518.912
γ -terpineno	77.831	151.933	181.355	-
cis-sabineno	40.246	72.381	72.944	249.910
terpinoleno	54.166	66.868	113.913	132.478
Monoterpenos oxigenados				
linalol	192.434	430.029	392.574	258.013
chrysanthenone	55.176	109.776	105.835	-
canfora	3.883.196	7.608.827	7.703.956	9.219.868
borneol	162.589	256.871	284.162	691.046
α -terpineol	270.099	472.210	524.226	994.236
verbenona	1.444.885	2.756.322	2.680.076	1.654.856
Sesquiterpenos				
β -cariofileno	714.917	1.800.773	1.548.509	1.409.608
α -amorfeno	-	264.938	223.288	-
β -bisaboleno	-	90.587	72.380	-
Outros compostos oxigenados				
acetato de bornila	76.077	172.088	151.231	238.867

1,1%

É equivocado afirmar que, embora um composto apresente uma maior área absoluta do que outro composto em um mesmo cromatograma, que esse esteja presente em uma maior quantidade no extrato. Pois sabe-se que cada composto responde de forma diferente ao detector, dessa forma ocorre uma interpretação equivocada sobre a real composição de um extrato e seus compostos majoritários. A fim de transpor essa incerteza, outra forma de quantificação foi utilizada em etapa posterior.

4.1.5 Considerações sobre a PRIMEIRA etapa

Foi possível verificar a localização do óleo essencial na matriz vegetal do alecrim, nos tricomas glandulares peltados (diâmetros de 40 a 60 μm) localizados na região abaxial da folha. Observa-se o aumento do rendimento do extrato supercrítico com o aumento da pressão sob temperatura constante (120 *bar* a 35 °C) e consequente maior concentração dos seus compostos. Porém o extrato hidrodestilado com menor rendimento comparativamente ao processo de ESC, apresentou maior quantidade de monoterpenos e de um monoterpeno oxigenado, a cânfora.

Foi avaliado a solubilidade experimental do extrato de alecrim em CO₂, com o uso de baixas vazões de solvente a 150 *bar* e 35 °C, onde pôde-se comprovar a hipótese de que um maior tempo de contato do solvente com o soluto levaria à uma possível saturação. Os dados obtidos indicaram essa premissa, salvo para vazões inferiores a 0,45 *mL/min*. O maior rendimento do extrato supercrítico de alecrim nas condições testadas foi 4,31 % para a condição de 250 *bar* e 55 °C.

Os extratos obtidos foram armazenados sob refrigeração para posterior avaliação de sua atividade antimicrobiana *in vitro* e em contato direto com alimento.

4.2 SEGUNDA etapa

Foram realizados ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato SC de alecrim de origem brasileira, frente a alguns microrganismos patogênicos *in vitro*, estes responsáveis pela contaminação e deterioração de alimentos cárneos. Os extratos também foram avaliados em contato direto com o alimento (presunto cozido embalado a vácuo), com objetivo de aumentar a vida de prateleira desse produto.

4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos

Os resultados obtidos com os diferentes métodos, *in vitro*, de avaliação do potencial antimicrobiano do extrato de alecrim SC, podem ser observados na Tabela 33. Na Figura 31 são apresentadas as fotografias das placas de Petri nas quais foram realizados os testes, onde foram tomadas as medidas dos halos de inibição.

Tabela 33 – Halo de inibição do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), nas concentrações de 100% e 50% (v/v), frente às bactérias gram-positivas testadas.

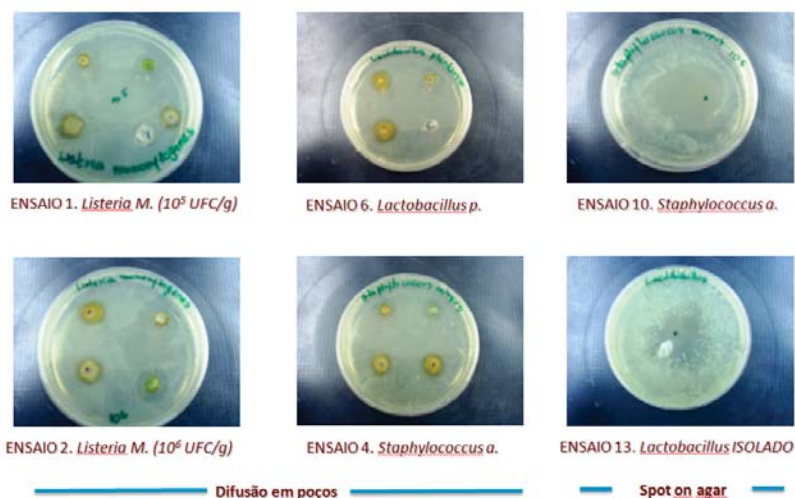
Microrganismo indicador	Método	Espessura do halo de inibição (mm) ¹	
		100%	50%
<i>Listeria monocytogenes</i>	Discos	2,75 ± 0,28	1,62 ± 0,25
	Gota	1,75 ± 0,28	1,37 ± 0,25
	Poços	4,12 ± 0,25	1,45 ± 0,52
<i>Staphylococcus aureus</i>	Discos	3,15 ± 0,94	1,87 ± 0,15
	Gota	1,25 ± 0,30	1,42 ± 0,30
	Poços	4,17 ± 0,47	2,12 ± 0,22
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Discos	2,10 ± 0,49	1,85 ± 0,33
	Gota	2,62 ± 0,47	2,12 ± 0,47
	Poços	4,25 ± 0,28	2,37 ± 0,47

¹ média de quatro replicatas.

De modo geral, verificou-se inibição sobre bactérias gram-positivas, ao passo que não houve inibição das cepas de bactérias gram-negativas testadas. Estes resultados estão de acordo com

dados apresentados na literatura, em que a inibição de bactérias gram-negativas não é verificada ou é menor do que aquela observada para as bactérias gram-positivas (IBÁÑEZ et al., 1999; IBÁÑEZ et al., 2003; GENENA et al., 2008). Já em um estudo conduzido por Gachkar et al. (2007), verificou-se atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim contra *E.coli*, além de *S.aureus* e *L.monocytogenes*. A maior inibição se deu sobre o *Staphylo-*

Figura 31 – Ensaio de avaliação antimicrobiana do extrato de alecrim



coccus aureus e a *Listeria monocytogenes*, ambos, bactérias patogênicas reconhecidamente importantes em produtos de origem animal (KLESPER; CORWIN, 1962). Também foi observada inibição sobre o *Lactobacillus plantarum*, sugerindo uma possível atividade antibacteriana contra espécies de *Lactobacillus* envolvidas na deterioração de produtos tais como embutidos cárneos. Segundo Leal et al. (2003), as bactérias ácido lácticas constituem uma parte da microbiota inicial das carnes, a qual se desenvolve facilmente após o seu processamento, estocadas em baixas temperaturas, embaladas a vácuo ou em atmosfera modificada. Ainda segundo a autora, as linhagens de bactérias ácido lácticas geralmente consideradas como naturais em carnes e produtos cárneos são: *Carnobacterium piscicola*, *C. divergens*, *L. sakei*, *L. virides-*

cens, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. Gelidum*.

Dentre os métodos utilizados, o método de difusão em discos mostrou-se mais apropriado quando da utilização do extrato de alecrim do que o método de difusão em gotas, por evitar o espalhamento do óleo sobre o ágar e a consequente irregularidade do halo formado. O método de difusão em poços também se mostrou apropriado, com a vantagem de permitir a aplicação de um maior volume de extrato. Dessa forma, o extrato SC de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtido a 120 bar e 35°C apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas testadas, especialmente *S.aureus* e *L.monocytogenes*. Os resultados obtidos indicam a possível aplicação deste extrato como conservante natural em alimentos em que estes microrganismos são importantes e nos quais o aroma e sabor conferidos pelo extrato podem ser desejáveis, tais como embutidos cárneos.

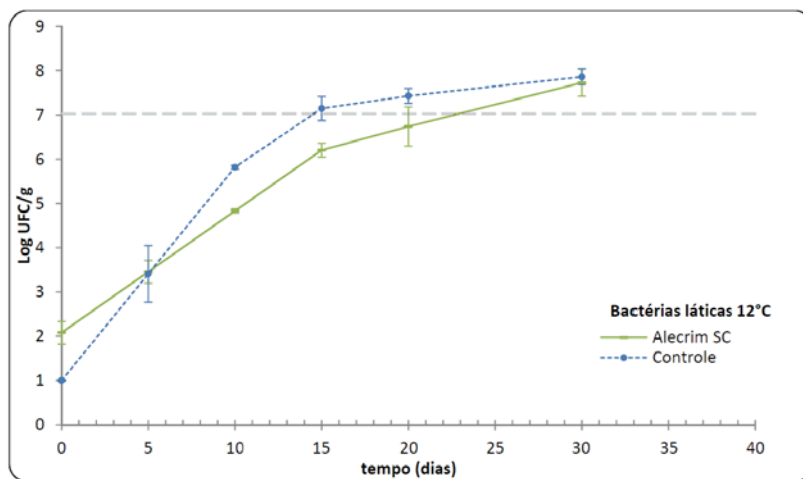
4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em presunto cozido embalado a vácuo, comercial

O produto após ser recolhido na unidade produtora e trazido ao laboratório foi submetido ao processo de abertura de sua embalagem original. Esse processo foi realizado em câmara asséptica de fluxo laminar, no laboratório de microbiologia LAB-CAL/CAL/UFSC. Após a retirada do produto de sua embalagem original o mesmo foi imediatamente re-embalado com o filme polimérico impregnado com extrato (Alecrim SC) e óleo essencial hidrodestilado (Alecrim HD), em seguida submetido à vácuo e armazenado a 7°C e a 12°C durante 30 dias. A amostra controle sofreu o mesmo processo de re-embalo, porém sem tratamento (controle). Amostras foram analisadas nos períodos de tempo zero (logo após o procedimento de re-embalo), no 5°, 10°, 15°, 20° e 30° dia de armazenamento. As análises microbiológicas para determinação de bactérias lácticas e psicrófilos foram efetuadas nestes períodos. Todas as análises foram realizadas em

triplicata. A vida de prateleira dos produtos cárneos é definida como o tempo de estocagem até a sua deterioração. O ponto de deterioração pode ser definido como um certo nível aceitável de grupos de microorganismos e/ou indicadores químicos, e/ou odor/sabor ou aparência inaceitável (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996). Dessa forma a estimativa da vida de prateleira das amostras (presunto cozido embalado à vácuo), do presente estudo, foi realizada baseada no seguinte critério:

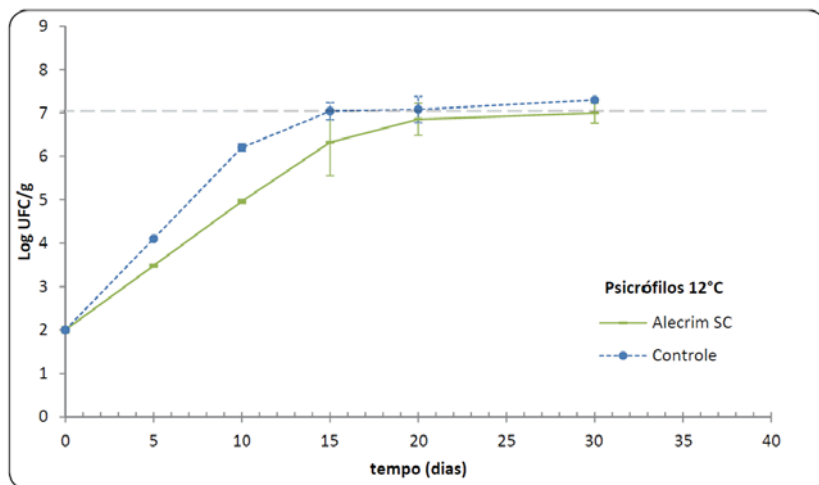
- ao nível de $7\text{-log}_{10} \text{ UFC/g}$ de Bactérias lácticas;
- ao nível de $7\text{-log}_{10} \text{ UFC/g}$ de Psicrofílos;

Figura 32 – Contagem de bactérias lácticas totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 12 °C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.



Para uma temperatura de armazenamento de 12 °C, simulada como temperatura de abuso na estocagem de alimentos cárneos processados, como o presunto (temperatura ideal de armazenamento 4 °C), na Figura 32, pode-se observar que a população de bactérias lácticas atingiram o valor de $7 \log \text{ UFC/g}$ que é considerado como o limite microbiologicamente aceitável, definido pela

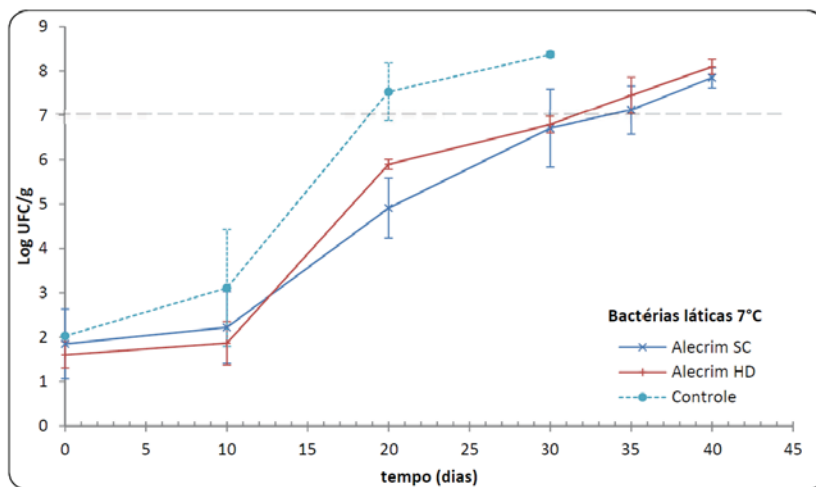
Figura 33 – Contagem de psicrófilos totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 12 °C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.



ICMSF, *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (Roberts{roJoint Chairman} et al., 2005) aproximadamente após o 15º dia para a amostra controle, e após o 20º dia para a amostra tratada com o alecrim supercrítico (Alecrim SC). Este período é considerado a vida de prateleira microbiológica do produto, baseado em dados microbiológicos de bactérias lácticas. A extensão na vida de prateleira (5-6 dias quando comparada com o controle) é devida à interação dos compostos do extrato (canfora, borneol, cineol, linalol e verbenona) com as bactérias, reduzindo sua taxa de crescimento. A diferença inicial na contagem de microorganismos deve-se ao método de preparo das amostras na ocasião. Na Figura 33, para os psicrófilos pode-se observar o mesmo comportamento ocorrido para as bactérias lácticas, sendo a contagem total de microorganismos inferior na amostra tratada com Alecrim SC, demonstrando o efeito do extrato como conservador em termos microbiológicos, mesmo em temperatura considerada de abuso, na estocagem do produto. Pode-se observar na Figura 35, que para uma temperatura de armazenagem a 7 °C, mais próxima da ideal (4 °C), as amostras com tratamento se comportaram de maneira similar aos ensaios a

12 °C, sendo a diferença entre a vida de prateleira entre as amostras com e sem tratamento, de 5-7 dias. O mesmo ocorreu para avaliação microbiológica de bactérias lácticas, Figura 34. Não se observou diferença entre os tratamentos com Alecrim SC e HD, nos estudos realizados, em termos de atividade antimicrobiana. Pode-se também afirmar que nos dois extratos os monoterpenos e os monoterpenos oxigenados estão presentes, Tabela 32.

Figura 34 – Contagem de bactérias lácticas totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 7°C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.



Segundo os resultados apresentados, foi demonstrado que é possível a utilização do extrato de alecrim, tanto aquele extraído com CO₂ supercrítico quanto por hidrodestilação, afim de para aumentar a vida de prateleira de produtos cárneos processados, como no caso do presunto cozido embalado a vácuo. Os dados da contagem de microrganismos em *Unidades Formadoras de Colônias por grama* (UFC/g) para as amostras estão apresentados na Tabela 34 e na Tabela 35.

Figura 35 – Contagem de psicrófilos totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 7°C, tratada com Alecrim SC e na amostra Controle.

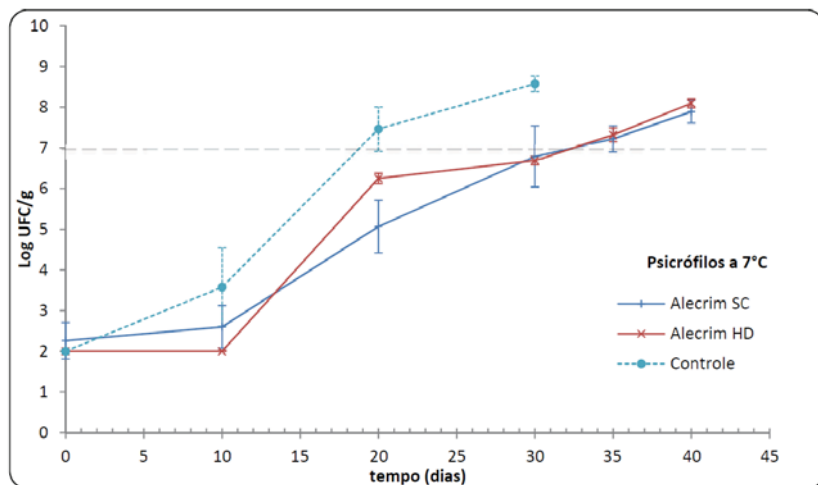


Figura 36 – Contagem de psicrófilos totais na amostra de presunto submetida a armazenagem de 7°C, tratada com Alecrim SC e na amostra.

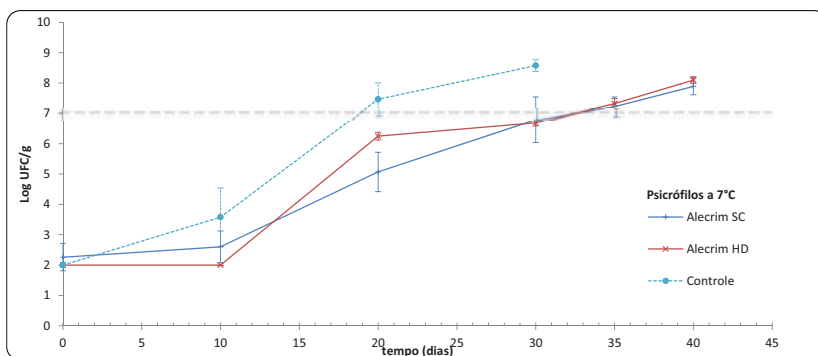


Tabela 34 – Contagem de microrganismos em presunto armazenado a 12°C

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Tratamento</i>	<i>PSI 7°C</i>	<i>PSI 22°C</i> <i>Log (UFC/g)</i>	<i>B. LATICAS</i>
0	Alecrim SC	2,00 ± 0,07	2,48 ± 0,21	2,08 ± 0,26
5	Alecrim SC	3,48 ± 0,03	3,66 ± 0,21	3,46 ± 0,26
10	Alecrim SC	4,96 ± 0,04	4,85 ± 0,10	4,83 ± 0,05
15	Alecrim SC	6,32 ± 0,77	6,46 ± 0,41	6,20 ± 0,16
20	Alecrim SC	6,85 ± 0,37	6,92 ± 0,28	6,74 ± 0,44
30	Alecrim SC	7,00 ± 0,23	7,60 ± 0,36	7,73 ± 0,30
0	controle	2,00 ± 0,03	2,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
5	controle	4,10 ± 0,01	3,85 ± 0,06	3,41 ± 0,64
10	controle	6,20 ± 0,08	5,71 ± 0,03	5,82 ± 0,04
15	controle	7,04 ± 0,20	6,73 ± 0,04	7,15 ± 0,27
20	controle	7,08 ± 0,30	7,00 ± 0,23	7,43 ± 0,17
30	controle	7,30 ± 0,04	7,91 ± 0,09	7,86 ± 0,18

Tabela 35 – Contagem de microrganismos em presunto armazenado a 7°C.

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Bactérias lácticas (7°C)</i>		
	Alecrim SC	Alecrim HD	Controle
0	1,85 ± 0,78	1,60 ± 0,30	2,03 ± 0,02
10	2,22 ± 0,81	1,86 ± 0,49	3,11 ± 1,32
20	4,91 ± 0,67	5,90 ± 0,11	7,53 ± 0,65
30	6,71 ± 0,88	6,79 ± 0,18	8,38 ± 0,06
35	7,12 ± 0,54	7,45 ± 0,41	n.a. ¹
40	7,85 ± 0,23	8,10 ± 0,17	n.a.

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Psicrófilos (7°C)</i>		
	Alecrim SC	Alecrim HD	Controle
0	2,26 ± 0,45	2,00 ± 0,01	2,00 ± 0,01
10	2,60 ± 0,52	2,00 ± 0,02	3,58 ± 0,96
20	5,07 ± 0,65	6,25 ± 0,13	7,46 ± 0,54
30	6,79 ± 0,75	6,69 ± 0,11	8,57 ± 0,19
35	7,22 ± 0,32	7,32 ± 0,17	n.a.
40	7,89 ± 0,28	8,10 ± 0,11	n.a.

¹ não analisado.

4.2.3 Considerações sobre a SEGUNDA etapa

Verificou-se a atividade antimicrobiana dos extratos supercrítico de alecrim contra bactérias consideradas deteriorantes em alimentos como a *Listeria monocytogenes* e o *Lactobacillus plantarum* e sobre uma cepa patogênica, o *Staphylococcus aureus*, todas gram-positivas. Para as bactérias gram-negativas testadas *Salmonella tythimurim* e *Escherichia coli* não foi observada ação significante.

Tanto o extrato supercrítico como o óleo essencial hidrodestilado do alecrim apresentaram ação antimicrobiana sobre as bactérias lácticas e psicrófilas presentes no alimento, presunto cozido embalado à vácuo. Os testes realizados com os extratos em contato direto na superfície do alimento, estocado sobre condições abuso de temperatura, auxiliaram na sua preservação, com uma atividade antimicrobiana sobre esses grupos de microrganismos. De modo que foi possível prolongar a vida de prateleira desse produto cárneo em média 33 %.

Com base nesses resultados pode-se sugerir a aplicação dos extratos de alecrim como preservativo de alimentos cárneos embalados à vácuo, onde o sabor do mesmo possa ser desejado por consumidores, aumentando a estabilidade do produto, mesmo sob condições de abuso térmico na estocagem.

4.3 TERCEIRA etapa

Nessa etapa foi analisada a fase vapor (*headspace*) de amostras de alecrim (folhas secas inteiras, secas e moídas, secas e moídas pós-extração SC, do extrato SC e do extrato HD). Entende-se que os compostos presentes na fase vapor da amostra são aqueles responsáveis pelo aroma característico da amostra, os quais são percebidos pelo olfato humano. Dessa forma, esses compostos são denominados, no presente trabalho, responsáveis pelo seu respectivo aroma. Sendo assim, os compostos presentes no aroma característico do alecrim foram determinados pela técnica de coleta de *headspace* e injeção em cromatografia de fase gasosa, GC-FID.

4.3.1 Determinação dos compostos presentes no aroma do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

A análise de *headspace* foi utilizada com o intuito de determinar quais compostos voláteis estão presentes na fase vapor das referidas amostras. As amostras de folhas secas, secas e moídas, e dos extratos (SC e HD) foram submetidas a análise de cromatografia gasosa com coleta de *headspace* em modo estático, em 3 diferentes temperaturas de equilíbrio, 35°C, 45°C e 60°C, para cada um dos tratamentos, conforme a Tabela 36.

Tabela 36 – Análises cromatográficas de headspace estático (HS-GC-FID) realizadas.

<i>Tratamentos</i>	<i>Sigla</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
alecrim seco (folhas inteiras)	ASF	35, 45 e 60°C
alecrim seco e moído	ASM	35, 45 e 60°C
alecrim seco e moído pós extração SC	ASM-PE	35, 45 e 60°C
extrato supercrítico de alecrim	EXT-SC	35, 45 e 60°C
óleo essencial de hidrodestilação do alecrim	OE-HD	35, 45 e 60°C

Pela Tabela 37, pode-se observar os compostos com maior expressão na fração volátil da amostra. O estudo foi baseado nos compostos observados no equilíbrio a 60 °C, onde é possível os observar em concentrações mais altas, para uma fácil identificação, pois se sobressaem perante os outros picos encontrados em

pequenas quantidades. Segundo (DELWICHE, 2004), as regras da físico-química indicam que há um aumento nos compostos voláteis sendo liberados de uma amostra quando essa é aquecida, e como resultado o odor (aroma) se torna mais intenso.

Na Figura 37 pode-se observar um comparativo entre os cromatogramas GC-FID de *headspace* (60 °C) dos tratamentos. Nota-se que o cromatograma para a amostra ASM-PE na escala da figura, não mostra os seus picos, porém os mesmos estão presentes em quantidades muito inferiores em relação aos outros tratamentos (área absoluta < 1.000), e são considerados traços, conforme Tabela 37. Isso se deve ao fato de que o processo extrativo em meio supercrítico retirou quase que totalmente os seus compostos voláteis, resultando em um material vegetal sem aroma característico de alecrim (desaromatizado) e consequentemente sem o óleo essencial.

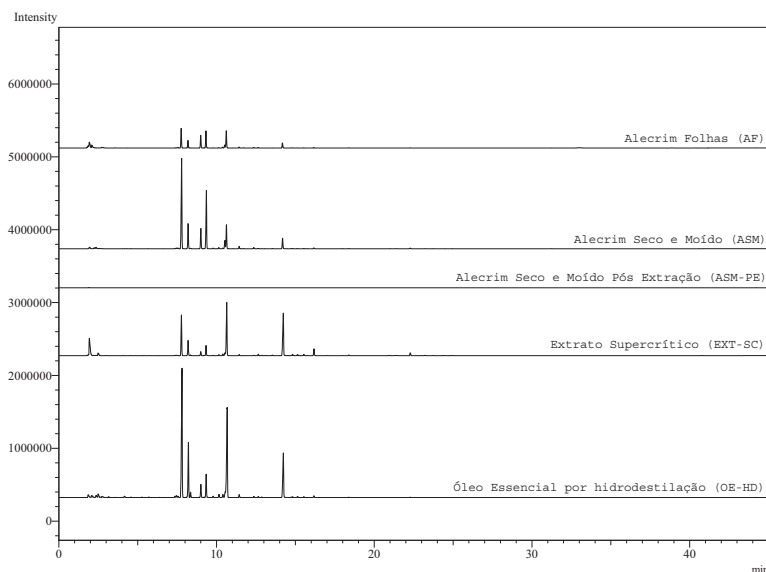
Embora não seja prudente tomar conclusões a respeito das concentrações dos compostos a partir dessa tabela pois cada amostra apresenta uma característica muito distinta uma da outra, como é o caso da matriz vegetal (sólido) e do seu extrato (líquido), pode-se obter uma visão geral do que está presente na fase vapor.

Pode-se concluir que essa técnica de análise, com coleta de *headspace* do material vegetal, demonstra bons indicativos dos compostos majoritários presentes na amostra, sem a necessidade de um procedimento extrativo para sua avaliação preliminar. Cabe ainda desenvolver técnicas quantitativas precisas para correlacionar aquilo que se obtêm via coleta de *headspace* da planta com aquilo que pode ser obtido com processo extrativo. Assim pode-se dizer que essa técnica ainda recente, em seu uso, pode servir como base para uma rápida caracterização dos compostos voláteis de uma matriz vegetal, sem a necessidade de um tratamento extrativo.

Pela técnica de coleta do *headspace* observa-se que existem compostos não identificados, que apresentam tempos de retenção entre 1,75 e 3,0 min, Figura 38. Nessa faixa de tempo ocorre normalmente o aparecimento do pico do solvente (etanol ou metanol). Esses compostos não identificados não são observados em

uma cromatografia gasosa de coleta de via líquida (análise normal com diluição da amostra em um solvente), pois o pico do solvente (etanol) se sobrepõe ao pico desses compostos. Desse modo não pôde-se quantificar ou determinar quais são esses compostos. Uma outra hipótese é a de algum resíduo de solvente remanescente no *liner* de injeção ou ainda um composto não identificado de alta pressão de vapor. Uma análise de *headspace* com espectro de massa acoplado seria necessário para sua identificação.

Figura 37 – Cromatogramas de *headspace* (60°C) dos tratamentos, ASF, ASM, ASM-PE, EXT-SC e OE-HD.

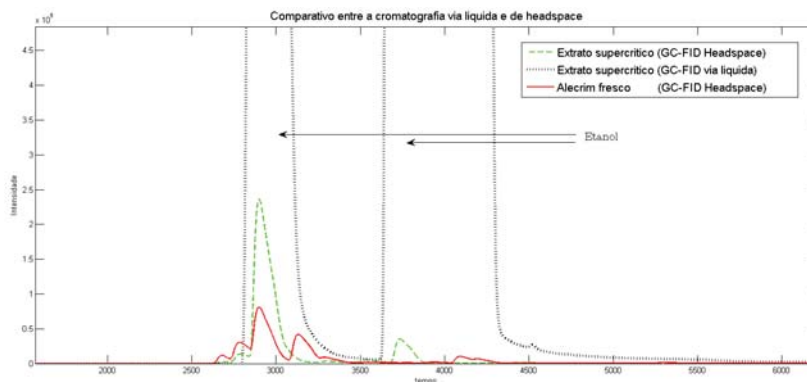


Ainda, pode-se observar que nas amostras do material vegetal, se sobre saem os compostos como, α -pineno, canfeno, β -pineno, β -myrceno, limoneno, eucaliptol e cânfora. Essa primeira parte da avaliação dos compostos presentes na fase vapor das amostras serviram como base exploratória para quantificação dos compostos presentes na matriz vegetal. Para a quantificação desses compostos uma outra metodologia foi utilizada e seus resultados estão apresentados na seção seguinte.

Tabela 37 – Cromatograma do headspace estático (GC-FID) das amostras, na temperatura de 60°C, expresso em área absoluta dos compostos detectados

<i>Compostos</i>	<i>Rt</i>	<i>ASF</i>	<i>EXT-SC</i>	<i>ASM-PE</i>	<i>ASM</i>	<i>OE-HD</i>
Monoterpenos						
α -pineno	7,772	813,765	4.014.528	traços	1.711,328	6.400,788
canfeno	8,196	310,215	1.025,064	traços	641,873	2.321,217
verbeneno	8,348	3,756	22,364	n.d	28,839	212,555
β -pineno	9,001	528,145	845,376	traços	179,923	558,039
β -myrceno	9,333	675,307	2.490,690	traços	407,740	958,707
para-cymeno	10,393	35,776	27,493	n.d	74,574	151,628
limoneno	10,532	136,990	375,892	traços	137,225	292,412
eucaliptol (Cineol)	10,646	712,358	993,187	traços	2.401,654	4.793,583
Monoterpenos oxigenados						
canfona	14,233	226,246	470,476	traços	2.303,790	2.407,621
verbenona	16,177	16,231	37,418	traços	295,689	75,037
Sesquiterpenos						
β -cariofileno	22,284	5,953	29,966	n.d	132,617	16,159
Outros compostos oxigenados						
acetato de bornila	18,384	7,445	5,256	n.d	30,972	15,262
compostos detectados		33	59	13	87	78

Figura 38 – Comparativo entre cromatogramas GC-FID de *headspace* (60°C) das amostras AF (—) e EXT-SC (---) com o de via líquida do EXT-SC (⋯) representando o pico do solvente (etanol e uma impureza), tempos de retenção entre 0,50 e 5,00 min.

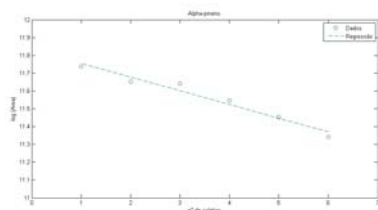
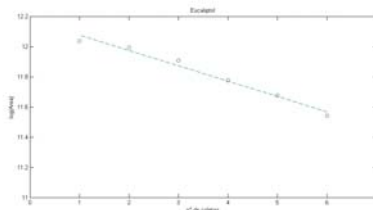


4.3.1.1 Análise quantitativa por MHE

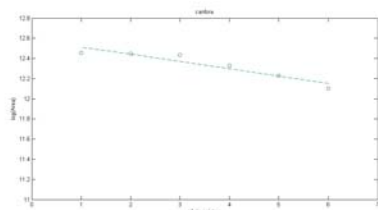
Foram realizadas análises quantitativas no *headspace* das amostras de alecrim fresco (sem tratamento) e no alecrim seco pela utilização da metodologia de múltiplas extrações (MHE). A curva de calibração foi feita segunda a metodologia descrita por Kolb e Ettre (1997), onde os compostos α -pineno, eucaliptol (1,8 cineol), canfora, borneol e acetato de bornila foram analisados em um total de seis coletas. As curvas obtidas para o $\log(\text{Area})$ vs n° de coletas de cada um dos compostos estão apresentados na Figura 39.

Para o pico do α -pineno um demonstrativo do decréscimo da área está demonstrado na Figura 40, para as seis coletas realizadas, o mesmo comportamento foi observado para os outros compostos (eucaliptol, cânfora, borneol e acetato de bornila).

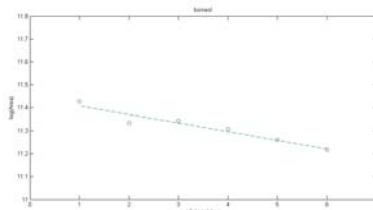
Com os dados obtidos nas curvas de calibração os compostos foram quantificados para cada uma das amostras. Pôde-se observar que na amostra sem tratamento os compostos majoritários estão presentes em quantidades superiores à amostra já seca. O fato se deve ao processo de secagem permitir que boa parte dos compostos majoritários presentes na fase vapor da amostra sejam

Figura 39 – Gráfico da dispersão do $\log(\text{Area})$ vs n° de coletas.(a) α -pineno

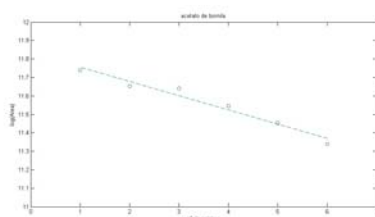
(b) eucaliptol



(c) canfora



(d) borneol



(e) acetato de bornila

retirados durante esse tratamento. Ocasionalmente uma redução de seu conteúdo na fase vapor, Tabela 39, outro fator que pode influenciar na redução do conteúdo da matriz vegetal é o tempo de estocagem após o tratamento, esse último não foi avaliado. Pode-se observar que dos compostos quantificados, o α -pineno, apresentou uma maior quantidade na fase vapor de ambas amostras. O borneol e o acetato de bornila apresentaram as menores quantidades. Outro composto que foi identificado e apresentou uma fração considerável no cromatograma foi o β -myrceno, Tabela 42 porém o mesmo não foi quantificado.

De uma forma geral os compostos que representam o aroma

Figura 40 – Seis cromatogramas agrupados, análise MHE dos padrões, pico do α -pineno, tempo de retenção 7,739 min.

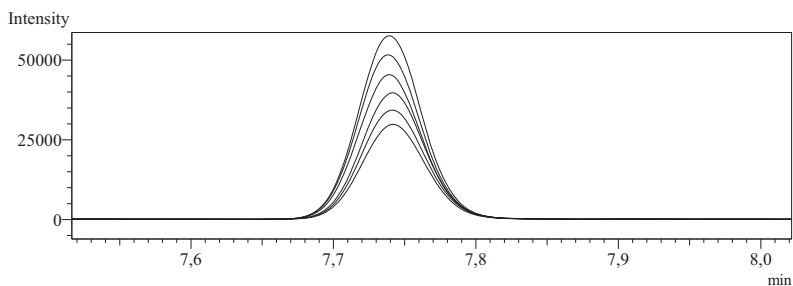


Figura 41 – Cromatogramas GC-FID de *headspace* (80°C) das amostras de folhas frescas (FF) e folhas secas (FS).

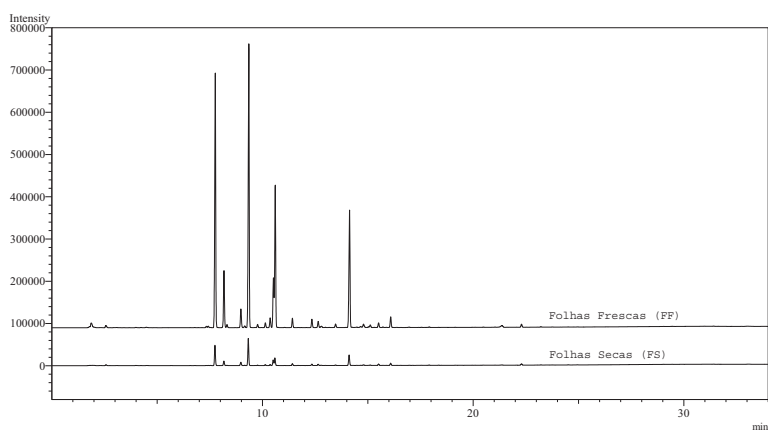
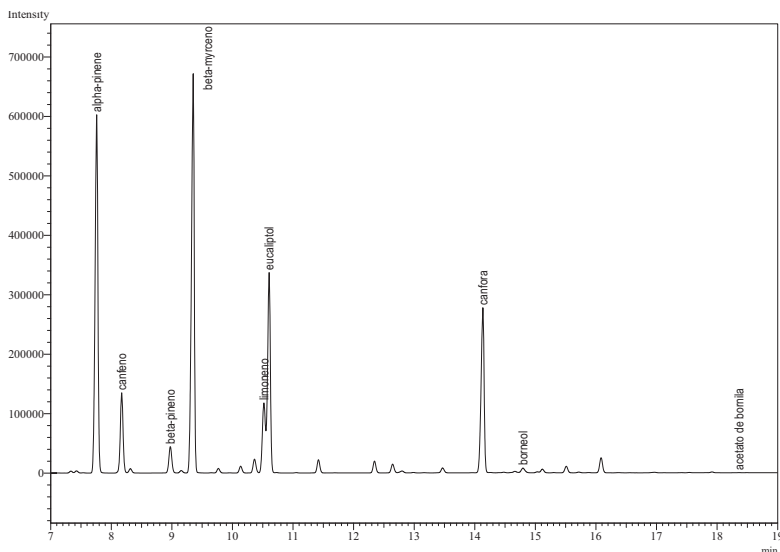


Tabela 39 – Quantidade mássica de composto presente na fase vapor das amostras.

Composto	Rt	Massa de composto (μg)	
		Folhas frescas	Folhas secas
α -pineno	7.739	180,55	8,13
eucaliptol	10.585	77,80	3,08
canfora	14.110	25,89	3,54
borneol	14.792	0,55	0,20
acetato de bornila	18.359	tr.	0,12

Figura 42 – Cromatogramas GC-FID de *headspace* (80°C) da amostra de folhas frescas (FF).



das folhas de alecrim são o α -pineno, canfeno, β -pineno, β -myrceno, limoneno, eucaliptol, cânfora. Sendo os compostos com maior expressão no cromatograma da fase vapor da amostra das folhas frescas, o β -myrceno e α -pineno, seguidos do eucaliptol e da cânfora. Isso pode ser considerado um "*fingerprint*" do aroma dessa matriz vegetal, cultivada no sudeste do Brasil.

4.3.2 Considerações sobre a TERCEIRA etapa

Nessa etapa foi possível avaliar a influência da extração supercrítica na desaromatização da amostra de folhas de alecrim (retirada de compostos voláteis). Técnicas de análise de *headspace* apresentaram resultados interessantes quanto à composição química presente na fase vapor das amostras em diferentes estados (líquido e sólido). Pôde-se observar indicativos de quais compostos são relevantes no aroma das amostras e as possíveis reduções de suas quantidades devido a um tratamento (como no caso da secagem).

Ainda, essa técnica pode ser expandida à um controle de qualidade no cultivo de matriz vegetais, visando otimizar a colheita delas em época ou período onde os compostos apresentem um maior concentração. E isso pode ser feito de forma rápida e dinâmica, com quantidades pequenas de amostra ainda em natureza, sem o inconveniente de procedimentos de secagem e extração. Dessa forma em um processo de obtenção desses compostos, considerados bioativos (agentes antimicrobianos) essa técnica seria útil no monitoramento da qualidade do vegetal.

4.4 QUARTA etapa

Após os procedimentos de verificação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato supercrítico do alecrim, técnicas de fracionamento do extrato foram avaliadas, visando uma pré-separação dos grupos de compostos, monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos.

Em alguns casos, a solubilização do soluto presente dentro da matriz vegetal ocorre somente em determinadas condições de alta pressão. Visando aumentar a eficiência do processo de extração de compostos bioativos, como o óleo essencial e os compostos fenólicos, diferentes pressões foram utilizadas em uma mesma matriz vegetal durante a extração para obter o fracionamento dos compostos. Para tanto, as condições de pressão foram variadas a uma temperatura constante de 35 °C durante a extração, além da adição de co-solvente, como modificador da polaridade do solvente. Isso foi efetuado em intervalos determinados de tempo. Em cada condição de pressão foram coletadas amostras para análise cromatográfica. Esse procedimento foi intitulado como fracionamento em degrau de pressão. [Ibáñez et al. \(1999\)](#), utilizaram CO₂ puro para extrair compostos lipofílicos das folhas de alecrim e CO₂ + modificador orgânico polar para extrair preferencialmente compostos fenólicos em uma extração com duas etapas.

Outro procedimento de fracionamento utilizando 3 separadores ciclônicos foi avaliado. As técnicas de fracionamento foram utilizadas com sucesso por alguns autores ([SIMÁNDI, 1998](#); [IBÁÑEZ et al., 1999](#); [REVERCHON](#); [MARCO, 2006](#)). Nesse procedimento três estágios de separação foram utilizados para precipitar o soluto da solução supercrítica. Além disso, é possível precipitar parte do soluto variando somente a temperatura ao invés da pressão (estágio de descompressão) ([REVERCHON, 1997](#)). Segundo [Reverchon \(1997\)](#) apenas alguns autores forneceram informações sobre os problemas associados com o processo de separação em meio supercrítico, onde até mesmo o arranjo dos estágios de separação pode ser a chave para o sucesso na implementação de um processo de fracionamento.

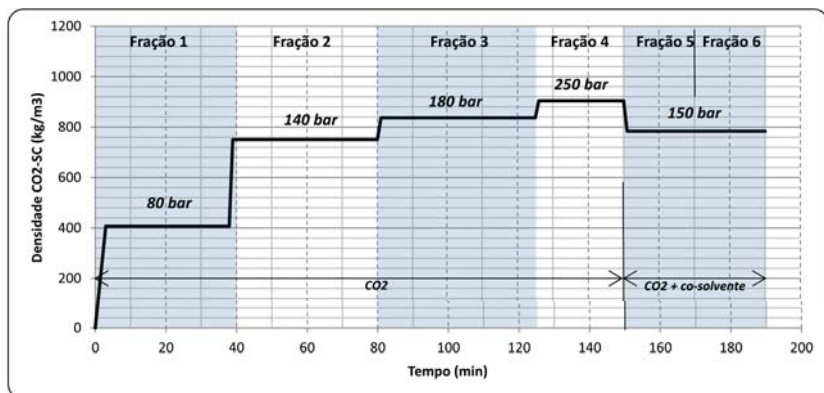
4.4.1 Fracionamento em degrau do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

Para a extração fracionada em degrau, os resultados obtidos são demonstrados a seguir. As análises cromatográficas das frações coletadas estão agrupadas na Figura 44 conforme Figura 43 para os degraus de pressão a 35 °C. Observa-se na Tabela 40 a diferença entre os compostos de cada uma das frações coletadas. Na fração 1 (80 bar) estão presentes os compostos mais voláteis (pinenos, eucaliptol, canfora, α -terpineol, verbenona), na fração 2 (140 bar) pode-se observar a predominância de alguns compostos como (γ -terpineol, α -terpineol, verbenona e óxido de cariofileno). Nas frações 3 (180 bar) e 4 (250 bar) poucos compostos puderam ser identificados, segundo a biblioteca de massa disponível no equipamento de análise de GC/MS (NIST05s). Nas frações 5 e 6 (150 bar + co-solvente) é quase inexistente a presença de compostos voláteis, sendo predominante os compostos pesados, incluindo ceras e parafinas. Nessa etapa do trabalho não foram feitas análises de HPLC para determinar os diterpenos fenólicos (ácidos orgânicos) das frações.

Cabe notar que os compostos como α -pineno, canfeno, β -pineno e β -myrceno foram aparentemente "esgotados" na primeira etapa da extração (80 bar, 40 min). Os compostos como paracymeno, limoneno, eucaliptol e γ -terpineno apresentaram traços nas frações 2 e 3, e voltaram a ser detectados na fração 4 (250 bar). Uma hipótese para a ocorrência desse fenômeno seria a formação de caminhos preferências dentro do leito de extração, onde esses podem ser alterados quando ocorre uma variação da pressão de extração, ou seja um distúrbio que influencia no fluxo de solvente, ou ainda, uma mudança na estrutura física da planta (STAMENIC et al., 2010), além disso o transporte de solutos líquidos (óleo essencial) pode ser melhorado pela alteração de pressão (DAUKVSAS et al., 2002). Alguns monoterpênos oxigenados foram concentrados na fração 2 (140 bar), como o γ -terpineol e o α -terpineol. O óxido de cariofileno apresentou sua maior concentração também na fração 2. Outros compostos não identificados, de provável tamanho de cadeia $> C_{15}$, foram concentrados nas

frações 3 e 4, supõe que esses sejam compostos parafínicos, comumente encontrados nessa planta.

Figura 43 – Variação da densidade do CO₂ ao longo da extração fracionada em degrau a 35 °C - SFE-II.



Com essas análises é possível demonstrar o efeito da extração fracionada na mesma matriz vegetal, onde em cada fase (degrau de pressão) são retirados determinados grupos de compostos. Desta maneira pode-se dizer que ocorre uma lavagem dos compostos solúveis, ou mais solúveis naquela determinada condição. Assim, é possível concluir que essa técnica pode ser utilizada para uma pré-separação de um determinado grupo de compostos de interesse. No presente trabalho foi possível obter uma fração rica em monoterpenos (fração 1 a 80 bar) e outra rica em monoterpenos oxigenados (fração 2 a 140 bar). Sendo a fração 3 (180 bar) com predomínio de compostos de maior massa molecular, como ceras e compostos parafínicos.

4.4.2 Fracionamento do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) com separadores ciclônicos.

Foi avaliada a seletividade do processo de fracionamento do extrato de alecrim, separadores ciclônicos foram utilizados nos estágios de precipitação do soluto. As etapas de separação utilizando diferentes condições operatórias foram investigadas e

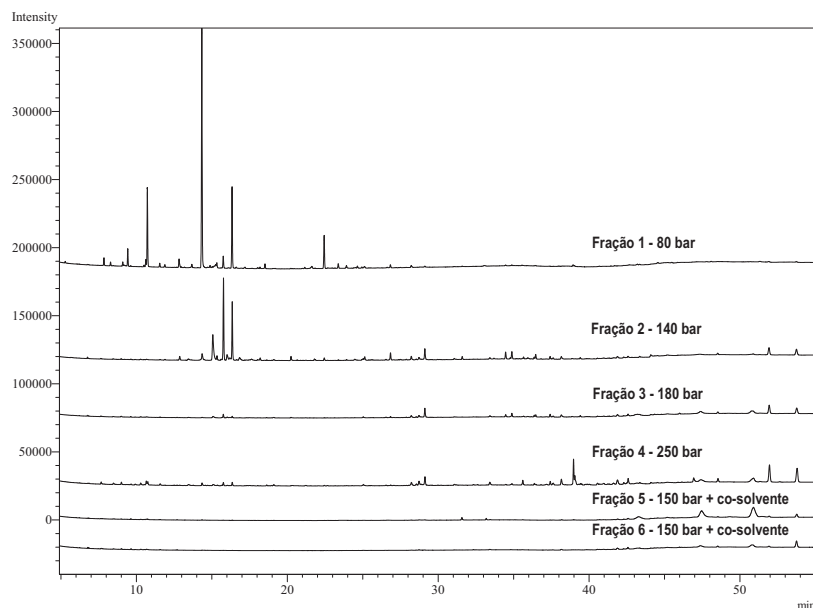
Tabela 40 – Valores de área absoluta dos picos do cromatograma das frações coletadas na extração fracionada em degrau a 35°C - SFE II.

Composto ²	Ret. Time	Área absoluta ¹ dos picos das frações n°					
		1	2	3	4	5	6
Monoterpenos							
α-pineno	7,847	15.359	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
canfeno	8,286	7.848	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
β-pineno	9,095	9.222	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
β-myrceno	9,426	36.614	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
para-cymeno	10,507	3.635	tr.	tr.	1.013	n.d	n.d
limoneno	10,626	16.550	tr.		10.583	n.d	n.d
eucaliptol (1,8 cineol)	10,725	172.600	tr.	tr.	7.801	n.d	n.d
γ-terpineno	11,545	8.369	tr.	tr.	3.271	n.d	n.d
Monoterpenos oxigenados							
terpineol	11,881	6.381	1.311	n.d	n.d	n.d	n.d
linalool	12,824	25.051	10.080	n.d	n.d	n.d	n.d
canfora	14,336	586.109	17.672	n.d	6.525	n.d	n.d
γ-terpineol	15,063	tr.	109.851	5.659	1.110	n.d	n.d
α-terpineol	15,754	28.672	190.929	7.350	7.610	n.d	n.d
verbenona	16,339	190.214	129.081	2.956	7.964	n.d	n.d
Sesquiterpenos							
caryofileno	22,442	84.754	6.461	tr.	1.549	n.d	n.d
α-caryofileno	23,376	11.919	1.411	n.d	n.d	n.d	n.d
β-bisaboleno	24,644	4.151	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Outros compostos oxigenados							
óxi. cariofileno	26,831	7.454	17.346	2.437	1.361	n.d	n.d
Compostos não identificados							
N.I	28,219	tr.	9.232	4.947	7.997	tr.	tr.
N.I	34,469	tr.	18.076	5.801	14.416	tr.	tr.
N.I	36,365	tr.	5.221	tr.	3.752	tr.	tr.
N.I	51,925	tr.	31.521	37.747	77.399	tr.	tr.

^atr. - traços < 1000 ; n.d - não detectado.

^bN.I - não identificado.

Figura 44 – Cromatogramas (GC-FID) das frações provenientes da extração fracionada em degrau a 35 °C - SFE II.



os compostos majoritários foram quantificados. [Simándi \(1998\)](#) investigou o fracionamento de óleo resina de orégano para obter extratos com diferentes qualidades. A extração foi realizada a 40 °C e 300 bar e a separação foi avaliada utilizando-se dois separadores (Sep. 1 - 80 bar/36-38 °C ou 90 bar/37-38 °C; Sep. 2 - 20 bar/20-25 °C). A aplicação dessa sequencia aumentou o conteúdo de óleo essencial no extrato. Isso por que normalmente a extração supercrítica (sob altas pressões, maiores que 150 bar) resulta em um extrato com outros compostos além daqueles normalmente presente no óleo essencial (os monoterpenos).

Para fracionar o extrato de alecrim utilizando separadores ciclônicos, diferentes condições operacionais foram utilizadas. Para essa finalidade a unidade de extração SFE-III (ENSIC, França) foi utilizada. Na Tabela [42](#) são apresentados os rendimentos obtidos em cada uma das extrações (Y_e) e individualmente em cada um dos separadores (Y_s). A temperatura

em cada um dos vasos de pressão foi controlada com banho termostático e a pressão do extrator com o uso de uma bomba de CO₂ (pelo *set-point*). A pressão em cada um dos separadores foi controlada com auxílio de uma válvula reguladora manual (Top-Industrie - França) posicionadas nas suas respectivas entradas. Após cada extração um procedimento de recuperação e limpeza era realizado e por esse processo pôde-se observar que resíduos do extrato permaneciam dentro dos vasos de separação. Isso ocorreu porque o resíduo do extrato precipitado dentro do separador permanecia nas paredes (líquido viscoso), tornando difícil sua retirada sem a abertura do dispositivo ou sem o auxílio de uma solubilização com outro solvente líquido. Isso já havia sido observado em outras unidades de ESC, como a SFE-I. As quantidades que permanecia dentro dos separadores foram determinadas após cada extração, com o procedimento de recuperação e subsequente evaporação do solvente.

Tabela 42 – Condições operacionais (P - pressão [bar] e T - temperatura [°C]) do fracionamento com separadores ciclônicos

n°	Extrator			Separador 1			Separador 2			Separador 3		
	P	T	Y _e (%)	P	T	Y _{s1} (%)	P	T	Y _{s2} (%)	P	T	Y _{s3} (%)
20	80	35	1,89 %	80	5	0,14 %	50	3	1,12 %	20	3	0,64 %
21	80	35	1,59 %	80	-4	0,17 %	50	5	1,24 %	20	5	0,17 %
22	80	35	1,34 %	80	5	0,30 %	50	35	0,94 %	20	35	0,10 %
23	80	35	2,02 %	80	-4	0,11 %	50	35	1,89 %	20	35	0,02 %
24	150	35	1,31 %	150	5	0,62 %	50	3	0,38 %	20	3	0,31 %
25	150	35	2,32 %	150	-4	0,89 %	50	5	0,92 %	20	5	0,51 %
26	150	35	1,93 %	150	5	0,18 %	50	35	1,73 %	20	35	0,02 %
27	150	35	1,91 %	150	-4	0,16 %	50	35	1,74 %	20	35	0,01 %

Por essas observações durante os procedimentos de extração pode-se dizer que os rendimentos de processos de extração supercrítica que utilizam vasos de separação na etapa de descompressão podem apresentar pequenas variações do denominado rendimento "real", ao menos, que se garanta toda a retirada e quantificação desse resíduo para a determinação do rendimento total da extração. Pouco se comenta sobre as dificuldades encontradas no operacional de uma extração supercrítica, o que varia de uma unidade para outra. Em especial cuidados devem ser tomados quando se utilizam vasos de separação para precipitação

do soluto. Para contornar esse problema na planta SFE-III, após cada extração, CO₂ (150 bar) + co-solvente etanol (P.A) à um vazão de 5 mL.min⁻¹ foi utilizado para a recuperação do extrato nos separadores. O mesmo era coletado juntamente com etanol durante aproximadamente 10 min, ou até que o solvente na saída tornou-se translucido, ou sem coloração aparente.

Os extratos foram precipitados em três separadores em série, o óleo essencial e as ceras (compostos parafínicos) foram coletados. O extrato obtido no primeiro separador era de coloração amarelo claro, no segundo, amarelo escuro pouco viscoso e no terceiro o extrato era líquido viscoso com coloração amarelo amarronzado escuro, Figura 45. Em contraste, o extrato obtido com um separador na unidade de ESC, SFE-I (LCP-UFSC, Brasil), era viscoso com coloração verde escura.

Observa-se que nas frações coletadas com o procedimento de recuperação utilizando etanol, quantidades significativas de ceras cuticulares eram precipitadas nos frascos coletores (precipitado branco visível nos tubos de ensaio com etanol), Figura 45. Esse precipitado foi separado e diluído em clorofórmio e analisado em GC-FID, onde foi possível verificar grandes quantidade do composto de cadeia entre C₂₄ a C₃₆, característico de ceras e parafinas, representados pelo composto n-octacosane (STASSI; SCHIRALDI, 1994). Isso devido ao fato de que boa parte dos ceras cuticulares ficavam retidas no interior do separador e eram removidas somente com o procedimento de limpeza.

A composição de cada fração de cada uma das extrações (n° 20 a 27) foram analisadas e quantificadas por GC-FID, conforme apresentado nas Tabelas 43 a 50. Foram quantificados os compostos considerados majoritários, com maior expressão na amostra, identificados anteriormente (seção 4.1.4) e de acordo com a literatura. A quantificação foi realizada nos extratos obtidos (**ext**) em cada um dos separadores e no sobrenadante do processo de recuperação (recuperado etanólico, **rec**).

Observa-se que para as condições testadas de pressão e temperatura nos separadores, não foi possível obter um fracionamento ideal, onde buscava-se separar os grupos de compostos com uma maior diferença, ou totalidade, entre suas concentrações

Figura 45 – Fotografia de amostras obtidas no experimento de ESCF n°25, da esquerda para a direita (separadores 1, 2 e 3), da esquerda para direita, os primeiros três tubos de ensaio são do extrato puro e os outros três são do procedimento de recuperação com etanol.

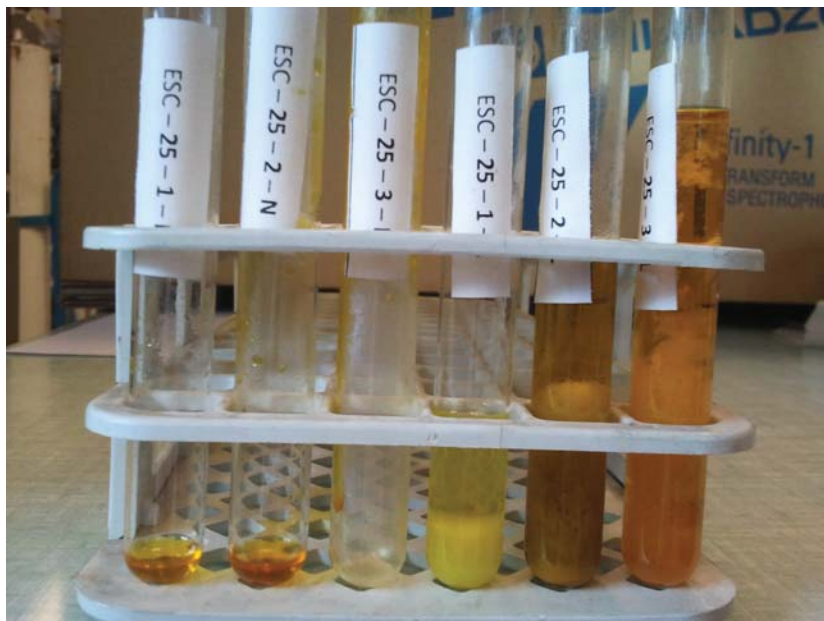


Tabela 43 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 20**.

Composto	ESCF n° 20 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	99,38	0,43	47,74	3,81	12,30	7,11
limonene	13,73	tr. ¹	14,71	2,70	7,14	3,05
eucaliptol (1,8 cineol)	93,27	3,16	93,13	31,66	47,22	25,51
canfora	221,96	28,29	204,76	122,67	137,79	53,10
borneol	4,83	1,28	6,49	5,09	7,93	3,60
acetato de bornila	8,43	2,06	7,04	4,32	4,93	1,54
trans-caryofileno	37,30	11,90	33,90	24,30	26,73	8,91

¹ - traço do composto, < 0,009 mg.

Tabela 44 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 21**.

Composto	ESCF n° 21 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	72,01	35,64	35,94	46,73	16,27	8,75
limonene	25,14	15,71	14,14	4,17	8,91	5,74
eucaliptol (1,8 cineol)	103,62	91,65	90,27	146,42	54,91	46,73
canfora	232,20	236,06	226,89	297,82	147,17	136,56
borneol	5,98	7,54	5,88	0,45	8,37	8,62
acetato de bornila	7,75	8,17	8,50	69,99	6,03	4,71
trans-caryofileno	33,95	37,39	41,55	44,78	33,81	24,67

Tabela 45 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 22**.

Composto	ESCF n° 22 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	60,50	tr. ¹	8,20	0,16	n.c. ²	1,11
limonene	14,02	tr. ¹	5,40	1,31		1,15
eucaliptol (1,8 cineol)	72,09	tr. ¹	48,34	1,91		11,73
canfora	167,57	24,37	170,59	8,51		62,16
borneol	2,99	tr. ¹	8,53	2,71		7,57
acetato de bornila	6,72	tr. ¹	5,85	0,41		2,82
trans-caryofileno	25,92	tr. ¹	32,92	3,99		20,62

¹ - traço do composto, < 0,009 mg.² n.c - não coletado, amostra insuficiente para análise.Tabela 46 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 23**.

Composto	ESCF n° 23 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	82,96	127,87	35,24	1,00	n.c. ¹	6,68
limonene	19,27	9,86	11,59	0,56		1,77
eucaliptol (1,8 cineol)	124,78	225,69	93,19	1,67		9,81
canfora	306,03	469,55	229,63	3,87		29,63
borneol	5,09	4,70	6,38	0,38		tr. ²
acetato de bornila	12,55	17,87	9,31	0,17		tr.
trans-caryofileno	45,06	61,99	45,49	1,27		8,53

¹ n.c - não coletado, amostra insuficiente para análise.² - traço do composto, < 0,009 mg.

Tabela 47 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 24**.

Composto	ESCF n° 24 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	82,37	125,14	25,51	28,92	6,80	4,61
limonene	12,34	1,44	10,15	8,49	4,19	2,84
eucaliptol (1,8 cineol)	105,63	150,70	66,10	62,19	33,23	22,53
canfora	231,46	257,50	152,31	133,09	97,84	66,35
borneol	4,73	0,48	6,61	6,02	9,19	6,23
acetato de bornila	8,44	9,63	4,40	3,62	2,95	2,00
trans-caryofileno	39,49	41,41	24,45	20,50	18,14	12,30

Tabela 48 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 25**.

Composto	ESCF n° 25 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	70,84	51,73	32,63	1,49	tr. ¹	1,25
limonene	13,41	17,78	9,28	0,80	1,42	0,81
eucaliptol (1,8 cineol)	96,35	86,45	70,41	7,11	15,04	7,86
canfora	213,25	195,16	138,78	18,39	111,69	20,79
borneol	5,42	2,56	8,03	2,86	11,67	1,92
acetato de bornila	7,43	5,44	3,54	0,00	5,17	3,97
trans-caryofileno	35,40	25,57	20,20	2,86	31,29	36,60

¹ - traço do composto, < 0,009 mg.Tabela 49 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 26**.

Composto	ESCF n° 26 [$mg_{composto}/g_{extrato}$]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	98,43	39,25	35,38	tr. ¹	n.c ²	tr.
limonene	12,76	13,25	12,20	0,57		tr.
eucaliptol (1,8 cineol)	97,39	71,09	81,10	2,39		13,39
canfora	220,01	182,09	195,28	8,10		66,65
borneol	4,25	26,19	6,36	0,68		6,93
acetato de bornila	8,72	tr.	6,78	2,42		12,88
trans-caryofileno	33,84	26,19	34,73	14,17		99,84

¹ - traço do composto, < 0,009 mg.² n.c - não coletado, amostra insuficiente para análise.

Tabela 50 – Composição química do extrato de alecrim (**ext**) e do recuperado etanólico (**rec**) obtidos nos separadores na **ESCF n° 27**.

Composto	ESCF n° 27 [<i>mg</i> _{composto} / <i>g</i> _{extrato}]					
	Separador 1		Separador 2		Separador 3	
	ext	rec	ext	rec	ext	rec
α -pineno	78,62	101,45	26,65	1,17	n.c. ¹	tr. ¹
limonene	13,18	27,25	11,69	0,41		0,59
eucaliptol (1,8 cineol)	104,35	132,69	71,37	2,27		6,09
canfora	222,46	277,72	183,58	6,90		33,20
borneol	5,74	6,62	8,15	tr.		tr.
acetato de bornila	7,93	8,63	5,97	tr.		tr.
trans-caryofileno	35,32	37,34	32,63	1,91		7,61

¹ n.c - não coletado, amostra insuficiente para análise.² - traço do composto, < 0,009 mg.

das frações. Porém no separador 1, para as condições testadas, uma maior concentração de α -pineno foi obtida em todos os experimentos, o que demonstra a capacidade de precipitação desse composto no separador sob temperatura reduzida e alta densidade (CO₂ no estado líquido). Devida à baixa temperatura dos dois primeiros separadores, foi possível observar a precipitação de ceras, embora elas estivessem presentes nos separadores, as mesmas não eram retiradas durante a coleta, devido a sua possível solidificação nestas condições.

No separador 2, com o aumento da temperatura (35 °C), nas extrações n° 22, 23, 26 e 27 observa-se a redução da concentração de compostos nos recuperados etanólicos. Isso pode ser explicado pela maior facilidade em retirar os compostos do separador com maiores temperaturas, onde a redução da viscosidade do óleo é favorecida por esse parâmetro. Onde a coleta do óleo depositado teve sua retirada facilitada, restando dentro do separador um extrato com baixa concentração de compostos majoritários, porém o mesmo apresentou quantidade consideráveis de compostos parafínicos. Outro fato interessante foi o de que a 35 °C (separador 2 e 3, extrações 22, 23, 26 e 27) poucos compostos foram precipitados no separador 3, e conclui-se que à essa temperatura os compostos majoritários foram arrastados pela corrente de saída ainda solubilizados na fase vapor

de CO₂. Seria difícil correlacionar a solubilidade dos compostos puros a esse fato, visto que a solubilidade da mistura pode variar em ordem de grandeza, quando comparado à cada composto na sua forma pura. O que torna a previsão desse sistema um tanto complexa.

Embora os experimentos tenham sido realizados com uma rigorosa preparação a fim de reduzir erros experimentais, uma variabilidade intrínseca ao processo demonstram que em alguns experimentos resultados diferentes podem ser obtidos em condições experimentais similares. É correto afirmar que mesmo pequenos ajustes nas válvulas podem produzir alterações nas velocidades do fluxo de CO₂ entre um separador e outro. Desse modo, técnicas de controle e automatização seriam necessários para uma boa avaliação das condições de fracionamento utilizando múltiplos separadores.

4.4.3 Considerações sobre a QUARTA etapa

Com o uso das técnicas de fracionamento foi possível obter extratos com diferentes composições químicas, na qual essas variações possam resultar em novas aplicações. Um exemplo de uso e aplicação desses extratos fracionados é na indústria de perfumes, onde as diferenças na concentração dos compostos majoritários pode levar a uma combinação de aromas diferenciada. Ainda, com uma constante supervisão e utilização da automação, o processo de fracionamento pode ter sua eficiência aprimorada (FLECK; TIEGS; BRUNNER, 1998).

Os dados obtidos com o fracionamento em rampa de pressão demonstra a possibilidade de se obter frações de monoterpenos oxigenados, sem a presença dos monoterpenos. O que demonstra a capacidade de se obter grupos de compostos com maior expressão em cada uma das frações.

Com o uso dos separadores ciclônicos foi possível demonstrar a obtenção de outras possíveis composições químicas nos extratos, como a obtenção de extratos com maior concentração de eucaliptol e cânfora, dois dos compostos com atividade antimicrobiana já comprovada. O extrato com essa característica

foi predominante nos recuperados etanólicos do separador 3 (20 *bar*), em quase todas as condições experimentais de extração.

Ainda seria possível combinar os dois métodos de fracionamento visando aprimorar ainda mais a obtenção dos grupos bioativos de preferência, com o uso de uma unidade automatizada.

4.5 QUINTA etapa

Foram avaliados nessa etapa, os procedimentos de extração do composto fenólico (antioxidante) por extração sólido-líquido em diferentes temperaturas (30 e 60) °C, em modo normal e com o auxílio do ultrassom. Foi quantificado o ácido rosmarínico extraído em cada um dos tratamentos. Além disso, avaliou-se a influência da extração supercrítica realizada na matéria-prima quanto a quantidade e AR recuperado. Foi avaliado o método de separação e purificação do AR por HPLC em modo preparativo, onde 10 mL de extrato bruto foi injetada para separação do ácido, cerca de 500× a escala analítica, onde foi avaliada a sua porcentagem de recuperação e seu grau de pureza. Para tanto foram testados solventes de baixa toxicidade, como etanol e água ultrapura.

4.5.1 Extração sólido-líquido

Foram testadas diferentes concentrações de etanol em água nas extrações sólido-líquido, buscando mapear a melhor faixa de polaridade para obtenção de uma máxima quantidade extraída do AR. Esse éster do ácido cafeico e do ácido 3,4 - dihidroxifenilático é um composto polar com inúmeras propriedades ativas já comprovadas (PETERSEN, 2003; LEE; KIM; PARK, 2007; De Oliveira et al., 2012).

Após a preparação das soluções padrão, curvas de calibração foram realizadas imediatamente antes de cada análise cromatográfica, para assegurar uma quantificação precisa e segura do AR após sua extração. Razboršek (2011) avaliou a estabilidade do *trans*-ácido rosmarínico sob diferentes condições de stress (luz solar, altas temperaturas, diferentes solventes e umidade) e constatou que o *trans*-AR após 24 h dissolvido (armazenado sob refrigeração -18 °C ao abrigo da luz) em EtOH ou MeOH puro sofreu uma redução do seu conteúdo em 17,9 % (RAZBORŠEK, 2011). Essa redução se deve em parte a sua isomerização em *cis*-AR, que é a sua forma degradada (PETERSEN, 2003).

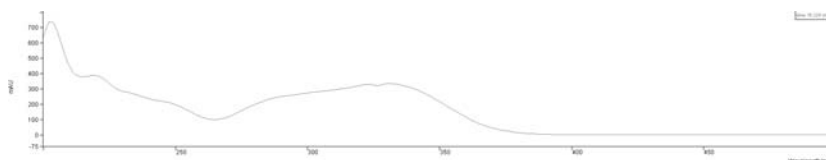
De modo a separar e identificar o isômero *cis*-AR outra me-

todologia foi testada com sucesso durante todos os experimentos. Desse modo essa metodologia foi utilizada como método principal de quantificação das amostras no presente trabalho (Método 3, Equipamento HPLC 2, Tabela 16).

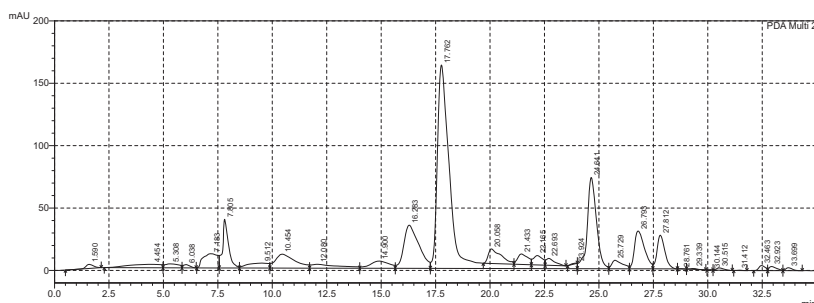
Assim, as afirmações feitas por Razboršek (2011) foram observadas durante as análises realizadas (HPLC), onde verificou-se a formação de um pico do *cis*-AR quando injetada a solução padrão preparada em MeOH ou EtOH puro decorridos alguns dias (aproximadamente sete dias) de sua preparação e armazenagem. No entanto não foi observada a formação ou degradação do *trans*-AR quando preparado em solução etanol:água (0:100, 30:70, 50:50) por um período superior a 20 dias, dessa forma foi escolhido a preparação dos padrões em etanol:água (30:70). Sendo assim, anteriormente a cada análise um nova curva com os padrões era realizada para aferir a integridade do AR (*trans*-AR) o que verificou sua estabilidade na solução de preparação. O AR conforme descrito no trabalho é citado como o *trans*-AR, que é a forma encontrada naturalmente em plantas (CANIOVA; BRANDS-TETEROVA, 2001). De modo a evitar uma descrição exaustiva de todos os testes realizados, somente algumas observações importantes foram elucidadas, como descrito anteriormente no início dessa seção. A maioria dos ensaios foram realizados de modo a se obter uma boa separação e resolução do pico de AR. Na maior parte do tempo, as metodologias das referências (Tabela 15) apresentaram uma baixa resolução de pico ou uma separação não satisfatória do extrato de alecrim, com os equipamentos utilizados. Dessa forma foi necessário um exaustivo desenvolvimento e ajustes na metodologia a fim de melhorar os parâmetros da análise HPLC (critérios de validação), utilizada nesse trabalho.

O espectro UV do AR é mostrado na Figura 46, medido na faixa de 200 a 500 nm. Esse espectro foi obtido durante a separação do padrão de AR no equipamento HPLC 1, o mesmo está de acordo com a literatura (WANG, 2004) e foi utilizado como base para identificação do compostos assim como o seu tempo de retenção, que variou conforme metodologia (gradiente do solvente). Na Figura 47 é apresentado o cromatograma típico do extrato de alecrim obtido nas extrações em batelada. O pico do AR foi lo-

Figura 46 – Espectro UV do padrão de ácido rosmarinico (Sigma-Aldrich).



calizado no tempo de retenção ($R_t = 17,762$) e apresentou maior expressão nos cromatogramas, monitorados pelo comprimento de onda a 330 nm . A determinação da concentração de AR obtido

Figura 47 – Cromatograma característico obtido no HPLC 2, extração com 30 % etanol à 30°C com ultrassom.

das folhas de alecrim, extraído com diferentes concentrações de etanol, nas temperaturas de 30°C e 60°C , com e sem auxílio do ultrassom foram avaliadas.

De modo a comparar as extrações em batelada (sólido-líquido) foi realizada a análise de variância para dois fatores (two-way ANOVA) para os dados de concentração de AR. Quando a ANOVA mostrou uma diferença significativa entre os dados (para um $\alpha=0,05$), uma análise de comparação múltipla foi realizada utilizando o teste de Tukey para identificar quais grupos apresentavam diferença entre si.

Para as extrações realizadas a 30°C observa-se a influência da interação entre os efeitos do pré-processamento da matéria-prima e da concentração de etanol na quantidade de AR ob-

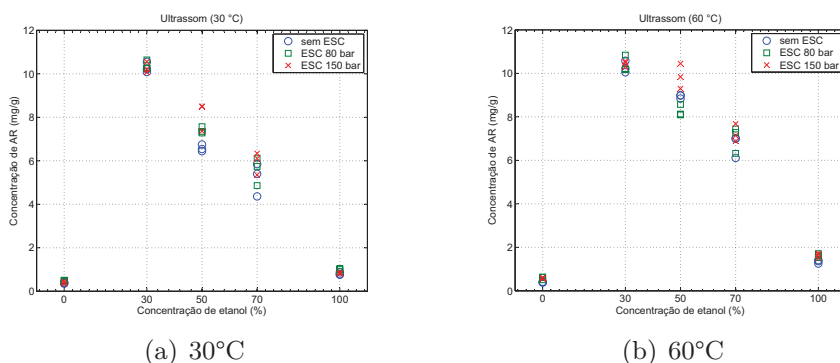
tida. Ou seja a combinação da concentração de etanol com o pré-tratamento apresentou diferenças significativas na concentração do AR, em alguns pontos experimentais. Para as extrações a 60 °C somente as extrações realizadas com auxílio do ultrassom apresentaram esse efeito de interação. Com o auxílio do ultrassom se tornou mais evidente a influência dos tratamentos.

4.5.1.1 Influência da concentração de etanol

De um forma geral nas extrações realizadas a 30 °C e 60 °C observa-se a influência da concentração de etanol na quantidade extraída de AR, conforme os dados nas Tabelas da ANOVA, 52, 54, 56 e 58, para $p < 0,05$.

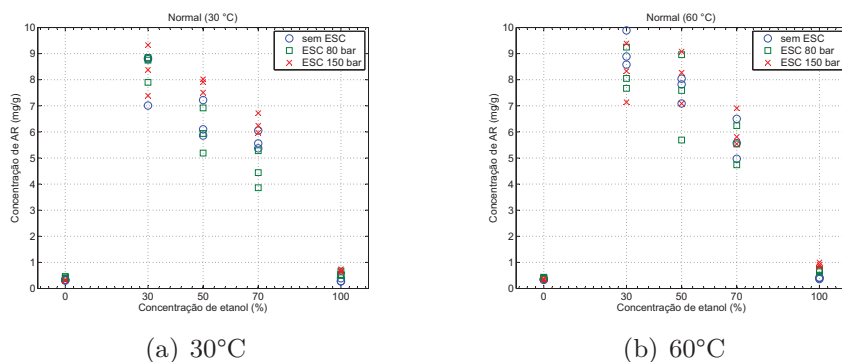
Os diagramas de dispersão revelam uma tendência da concentração de AR passar por um máximo na região próxima à concentração de 30 % de etanol, conforme mostrado nas Figuras 48 e 49 para os 3 tipos de pré-processamento da matéria-vegetal, sendo eles, sem ESC (material vegetal sem processamento), ESC 80 bar e ESC 150 bar (para o material vegetal utilizado pós extração supercrítica). Das concentrações de etanol em água

Figura 48 – Gráfico da dispersão da concentração de AR das extrações realizadas com ultrassom.



estudadas na extração do AR, observa-se que as maiores quantidades foram obtidos na faixa entre 30 % e 70 %. Sem a presença de etanol ou com concentrações superiores a 70 % foram obtidas as menores quantidades de AR, sendo inexpressiva quantidade

Figura 49 – Gráfico da dispersão da concentração de AR das extrações realizadas em batelada normal.



recuperada, Figuras 51 e 50. O máximo rendimento médio obtido foi de $10,46 \pm 0,13$ (mg/g) na concentração de etanol a 30 %. O mesmo comportamento nos rendimentos médios foram encontrados para a faixa de concentração de etanol para as diferentes temperaturas e modos de extração, sendo uma região de máximo a 30 %, decrescendo com o aumento e/ou redução da concentração de etanol. Pode-se afirmar que a presença do etanol tem influência positiva na obtenção do AR, porém sua faixa de concentração limita-se a uma região de ótimo mais precisamente entre 30 e 50 %. Isso pode ser explicado pelo fato de que a água apresenta um maior momento dipolar (quanto maior o momento dipolar maior a solubilidade de moléculas polares), porém o etanol facilita o rompimento de membranas celulares, o que permite o acesso direto da água ao AR, favorecendo assim a sua extração. No caso da água pura, a extração é dificultada pela água não romper as barreiras celulares e obter acesso ao AR. E no caso do etanol em elevadas concentração, sendo menor sua taxa de extração de moléculas polares (pelo fato de possuir menor momento dipolar) como é o caso do AR. Dessa forma a mistura dos solventes favorece a extração desse composto. Os resultados estão de acordo com a literatura (WANG, 2004; PENCHEV, 2010; PEEV et al., 2011).

Figura 50 – Concentração de AR (mg/g) das extrações realizadas com ultrassom.

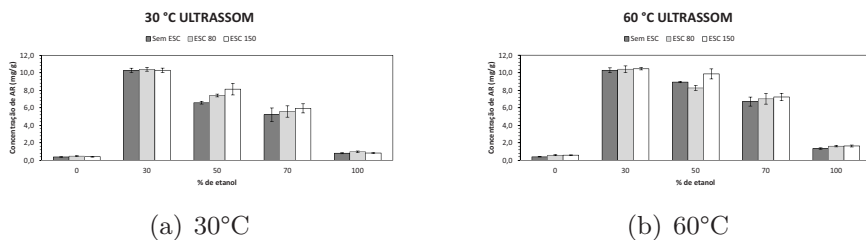
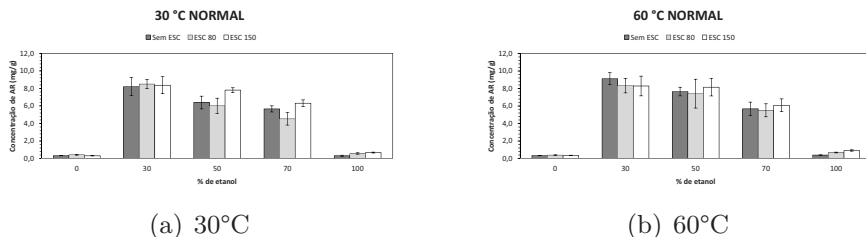


Figura 51 – Concentração de AR (mg/g) das extrações realizadas em batelada normal.



4.5.1.2 Influência do pré-tratamento da matéria-prima

Verificou-se que para as extrações realizadas é significativa a influência do tratamento de pré-processamento do material vegetal, salvo na condição de 60 °C (normal) que não apresentou diferença significativa a $p < 0,05$ na quantidade de AR extraído. Isso pode ser explicado pelos altos desvios padrão obtidos nesses ensaios, visto que a extração em modo normal não apresenta qualquer modo de agitação ou homogeneização durante o procedimento. Da mesma forma pôde-se verificar a existência de uma influência da interação entre os efeitos do pré-processamento e concentração de etanol na concentração de AR.

As análises de variância (ANOVA com dois fatores) demonstram que a 30 °C tanto para batelada normal como assistida por ultrassom existe uma forte influência do pré-processamento e da concentração de etanol na quantidade e AR extraída, assim como a interação entre esses fatores, Tabela 54 e 52.

Verificou-se principalmente que não há diferença entre o pré-processamento da matéria-prima na máxima quantidade de AR extraída a 30 % etanol. Isso significa dizer que não ocorreu uma influência negativa na quantidade de AR após a extração supercrítica, ou vale dizer que nessas condições (80 bar e 150 bar) não foi extraído o AR por extração supercrítica. Isso valida o pré-processamento como uma etapa importante no desenvolvimento de um processo global de obtenção de compostos bioativos, visado nessa tese. Dessa forma é válido afirmar que uma etapa anterior à extração sólido-líquido pode ser aplicada, sem prejuízo à matéria-prima, e sim como agregação de valor (matriz vegetal desaromatizada). Assim, a pré-extração de compostos com propriedades antimicrobianas (o extrato supercrítico) é realizada, anteriormente à extração sólido-líquido, e o que seria um resíduo desse processo extrativo (ESC) se torna uma matéria-prima disponível, beneficiada, ao procedimento de obtenção de AR. Sendo que nesse momento, a matriz vegetal, se encontra, de certa forma limpa, pois os compostos retirados na ESC não precisam serem separados na próxima etapa, a de purificação de AR. Vale salientar que além do AR, outros compostos antioxidantes estão presentes na matriz vegetal, como ácido carnósico, carnosol, rosmanol e ácido cafeico, porém os mesmos não foram determinados nesse trabalho.

Tabela 51 – Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 30 °C assistida por ultrassom.

Ethanol (%)	ULTRASSOM (30 °C) [mg/g]		
	sem ESC	ESC 80 bar	ESC 150 bar
0	0,38 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,03 ^a	0,41 ± 0,05 ^a
30	10,28 ± 0,24 ^a	10,39 ± 0,22 ^a	10,28 ± 0,25 ^a
50	6,58 ± 0,16 ^a	7,40 ± 0,16 ^{ab}	8,12 ± 0,65 ^b
70	5,20 ± 0,77 ^a	5,57 ± 0,65 ^a	5,93 ± 0,52 ^a
100	0,80 ± 0,06 ^a	0,98 ± 0,08 ^b	0,83 ± 0,04 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não compartilham diferença significativa, $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Tabela 52 – ANOVA, extração de AR em batelada assistida por ultrassom a 30 °C

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p
Entre pré-processamentos	1,698671	2	0,849336	6,602536	0,0042*
Entre concentração etanol	649,3199	4	162,33	1261,915	0,0000**
Interação	2,790907	8	0,348863	2,711982	0,0224*
Devido ao erro (resíduos)	3,859133	30	0,128638		
Total	657,6686	44			

* significativo a $p < 0,05$.** significativo a $p < 0,001$.

Tabela 53 – Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 30 °C em batelada normal.

Ethanol (%)	NORMAL (30 °C) [mg/g]		
	sem ESC	ESC 80 bar	ESC 150 bar
0	0,32 ± 0,02 ^a	0,42 ± 0,04 ^b	0,31 ± 0,02 ^a
30	8,21 ± 1,04 ^a	8,50 ± 0,52 ^a	8,37 ± 0,97 ^a
50	6,39 ± 0,73 ^{ab}	6,02 ± 0,87 ^a	7,81 ± 0,27 ^b
70	5,66 ± 0,35 ^{ab}	4,53 ± 0,71 ^a	6,31 ± 0,38 ^b
100	0,31 ± 0,06 ^a	0,57 ± 0,09 ^b	0,68 ± 0,06 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não compartilham diferença significativa, $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Tabela 54 – ANOVA, extração de AR em batelada normal a 30 °C

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p
Entre pré-processamentos	3,865444	2	1,932722	6,529271	0,0044*
Entre concentração etanol	483,8582	4	120,9646	408,6518	0,0000**
Interação	6,767733	8	0,845967	2,85791	0,0173*
Devido ao erro (resíduos)	8,880267	30	0,296009		
Total	503,3717	44			

* significativo a $p < 0,05$.** significativo a $p < 0,001$.

Tabela 55 – Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 60 °C em batelada normal.

Ethanol (%)	NORMAL (60 °C) [mg/g]		
	sem ESC	ESC 80 bar	ESC 150 bar
0	0,34 ± 0,02 ^a	0,40 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,03 ^a
30	9,12 ± 0,68 ^a	8,32 ± 0,82 ^a	8,29 ± 1,13 ^a
50	7,65 ± 0,49 ^a	7,41 ± 1,64 ^a	8,15 ± 1,00 ^a
70	5,68 ± 0,77 ^a	5,51 ± 0,75 ^a	6,09 ± 0,72 ^a
100	0,40 ± 0,03 ^a	0,69 ± 0,05 ^b	0,92 ± 0,08 ^c

Médias seguidas pela mesma letra não compartilham diferença significativa, $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Tabela 56 – ANOVA, extração de AR em batelada normal a 60 °C

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p
Entre pré-processamentos	0,64624	2	0,32312	0,601551	0,5540
Entre concentração etanol	543,5265	4	135,8816	252,9704	0,0000 ^{**}
Interação	2,474404	8	0,309301	0,575824	0,7890
Devido ao erro (resíduos)	16,11433	30	0,537144		
Total	562,7615	44			

^{**} $p < 0,001$.

Tabela 57 – Quantidade de AR obtido por extração em batelada a 60 °C em batelada auxiliada por ultrassom.

Ethanol (%)	ULTRASSOM (60 °C) [mg/g]		
	sem ESC	ESC 80 bar	ESC 150 bar
0	0,39 ± 0,02 ^a	0,59 ± 0,06 ^b	0,58 ± 0,03 ^b
30	10,29 ± 0,27 ^a	10,41 ± 0,37 ^a	10,46 ± 0,13 ^a
50	8,94 ± 0,08 ^a	8,26 ± 0,27 ^a	9,86 ± 0,57 ^b
70	6,71 ± 0,52 ^a	7,01 ± 0,61 ^a	7,23 ± 0,41 ^a
100	1,34 ± 0,08 ^a	1,62 ± 0,09 ^b	1,63 ± 0,11 ^b

Médias seguidas pela mesma letra (linha) não compartilham diferença significativa, $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Tabela 58 – ANOVA, extração de AR em batelada assistida por ultrassom a 60 °C

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p
Entre pré-processamentos	1,605684	2	0,802842	8,181693	0,0015*
Entre concentração etanol	709,3172	4	177,3293	1807,147	0,0000**
Interação	2,972604	8	0,371576	3,786693	0,0035*
Devido ao erro (resíduos)	2,9438	30	0,098127		
Total	716,8393	44			

** $p < 0,05$.** $p < 0,001$.

4.5.1.3 Influência da temperatura

De modo a avaliar a influência da temperatura nas extrações do AR, foi avaliado pareadamente os tratamentos de cada tipo de extração (normal e ultrassom) independentemente, com cada tipo de pré-tratamento, evitando a influência desse na resposta de comparação entre as temperaturas. Para isso a ANOVA de um fator foi utilizada ($\alpha = 0,05$). Foram detectadas diferenças estatisticamente significantes (intervalo de confiança de 95 %) para concentração de etanol de (50 a 100) %. Assim, para as extrações realizadas com auxílio do ultrassom, o incremento na temperatura favoreceu a retirada de AR para as concentrações de etanol de 50 %, 70 % e 100 %, Tabela 59. Isso se deve provavelmente ao aumento da solubilidade do AR em etanol com o aumento da temperatura, e como consequência um processo extrativo ligeiramente mais eficiente para a condição testada.

A máxima concentração de AR foi obtida a 30 % etanol, e nessa condição não foi observada melhora no processo de extração. Sendo essa ultima afirmação válida para um desenvolvimento de um processo mais econômico, visto que para uma ampliação de escala de um processo de extração o custo energético pode influenciar negativamente.

Para os dados obtidos na extração em batelada normal não foi possível detectar diferença significativa na quantidade obtida de AR para as diferentes temperaturas. Isso se deve ao fato de uma maior variância dentro dos tratamentos o que reduz a probabilidade de se obter uma diferença entre as médias. Pode ser

Tabela 59 – Avaliação da influência da temperatura na extração de AR na extração auxiliada por ultrassom.

Etanol (%)	ULTRASSOM [<i>mg/g</i>]					
	sem ESC		ESC 80 bar		ESC 150 bar	
	30°C	60 °C	30°C	60 °C	30°C	60 °C
0	0,38±0,03	0,39±0,02	0,48±0,03	0,59±0,06	0,41±0,05	0,58±0,03
30	10,28±0,24	10,29±0,27	10,39±0,22	10,41±0,37	10,28±0,25	10,46±0,13
50	6,58±0,16 ^a	8,94±0,08	7,40±0,16 ^a	8,26±0,27	8,12±0,65 ^a	9,86±0,57
70	5,20±0,77 ^a	6,71±0,52	5,57±0,65 ^a	7,01±0,61	5,93±0,52 ^a	7,23±0,41
100	0,80±0,06 ^a	1,34±0,08	0,98±0,08 ^a	1,62±0,09	0,83±0,04 ^a	1,63±0,11

^a - Significante em relação a 60 °C do mesmo pré-processamento para $p < 0,05$.
média ± desvio padrão.

explicado pelo fato de que a extração realizada em modo normal, e sem auxílio de um sistema de agitação fez com que os valores obtidos apresentassem um maior desvio em relação a média, devido a uma falta de homogeneização da amostra durante o processo extrativo. Dessa forma a influência da temperatura não foi observada nos dados mostrados na Tabela 60, extrações realizadas em modo normal, salvo na extração realizada na concentração de etanol de 100 % no pré-processamento com ESC a 150 bar, o qual apresentou uma diferença significativa entre as duas temperaturas. Ou seja em batelada normal as diferenças foram menos evidentes, devido a variabilidade intrínseca dessa extração sem agitação ou mecanismo de homogeneização.

Assim o processo de extração com ultrassom a 30 °C é tão eficiente energeticamente na retirada do AR quanto a 60 °C, sendo economicamente mais interessante pela baixa temperatura de sua aplicação. Comparativamente o modo de extração por ultrassom retirou em média 19 % a mais de AR do que o modo em operação normal. Nesse mesmo modo operacional a diferença obtida com o incremento da temperatura na concentração de AR obtida não foi estatisticamente superior na condição de extração máxima (30 %).

Tabela 60 – Avaliação da influência da temperatura na extração de AR na extração em batelada normal.

Etanol (%)	NORMAL [mg/g]					
	sem ESC		ESC 80 bar		ESC 150 bar	
	30°C	60 °C	30°C	60 °C	30°C	60 °C
0	0,32±0,02	0,34±0,02	0,42±0,04	0,40±0,03	0,31±0,02	0,35±0,03
30	8,21±1,04	9,12±0,68	8,50±0,52	8,32±0,82	8,37±0,97	8,29±1,13
50	6,39±0,73	7,65±0,49	6,02±0,87	7,41±1,64	7,81±0,27	8,15±1,00
70	5,66±0,35	5,68±0,77	4,53±0,71	5,51±0,75	6,31±0,38	6,09±0,72
100	0,31±0,06	0,40±0,03	0,57±0,09	0,69±0,05	0,68±0,06 ^a	0,92±0,08

^a - Significante em relação a 60 °C do mesmo pré-processamento para $p < 0,05$.
média ± desvio padrão.

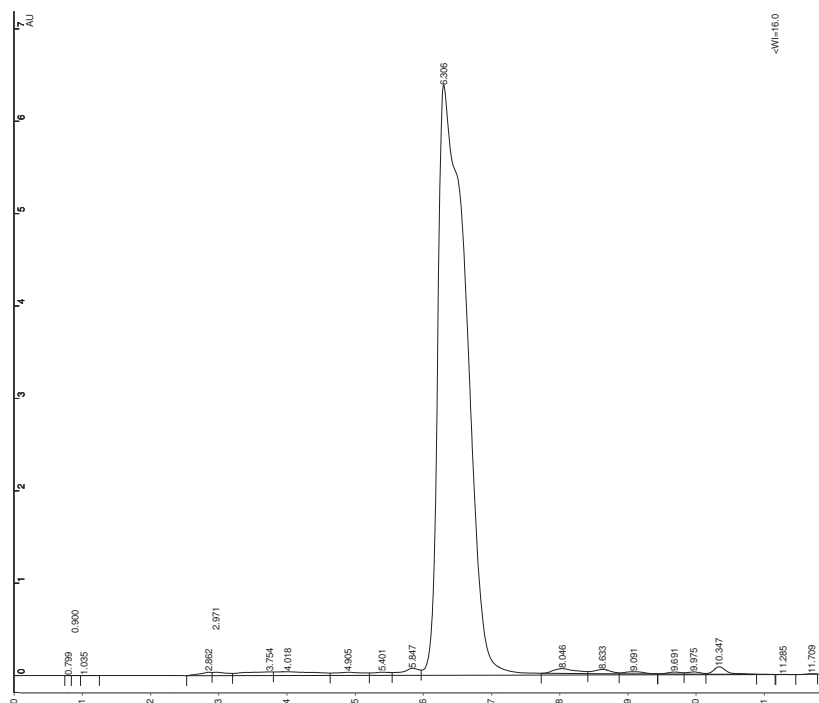
4.5.2 Separação e purificação do ácido rosmarínico via HPLC-Preparativo

O tempo de retenção do AR no HPLC-preparativo para as condições de análise foi determinado com uma solução padrão contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$. Assim, o tempo de retenção para o composto padrão foi de aproximadamente 6,306 *min*, Figura 52. Um ensaio exploratório inicial de purificação do ácido rosmarínico proveniente de um extrato de alecrim etanol:água (30:70) foi realizado, onde um total de 10 *mL* de mistura de extratos de alecrim, contendo $60,30 \pm 2,63 \mu\text{g/mL}$ de AR foi injetado. A partir dessa injeção foram coletados várias frações, com diferentes tempos de coleta, de onde foi confirmado por cromatografia (HPLC-analítico) a presença de AR na fração que compreendia entre 5,0 e 7,0 *min*. Nesse primeiro momento não foi contabilizada a quantidade recuperada.

Dessa forma a purificação do composto foi baseada no tempo de retenção, onde em cada intervalo de tempo amostras eram coletadas em frascos separados e armazenadas. Para cada injeção, três frações foram recuperadas, e analisadas em HPLC-MS (Shimadzu LCMS2020). Os intervalos de tempo foram fixados, conforme as faixas de tempo apresentadas na Figura 53.

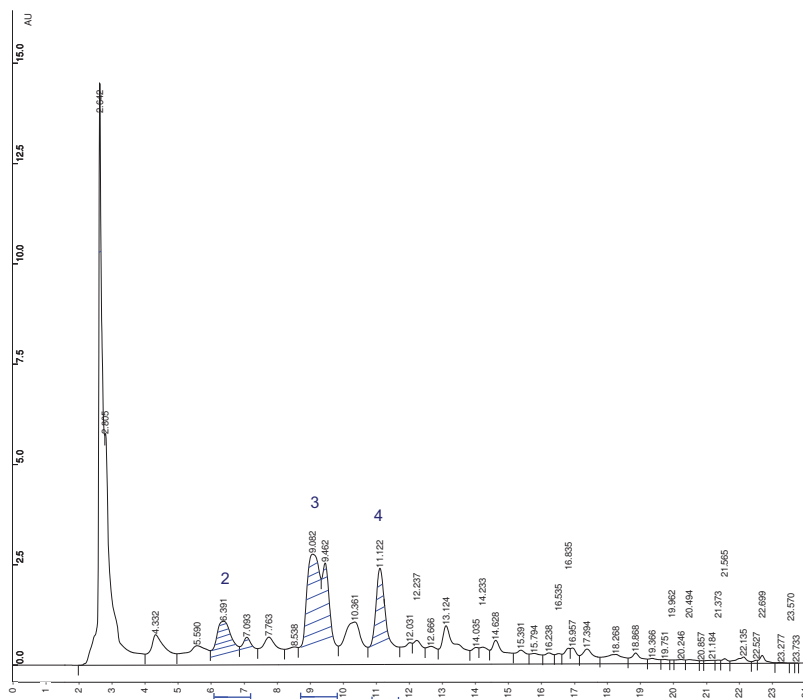
As análises das frações por HPLC-MS (escala analítica) foram feitas em cada uma das coletas, para frações 2, 3 e 4. Essas foram comparadas com o padrão do RA (tempo de retenção, es-

Figura 52 – Cromatograma característico obtido no HPLC-Preparativo, para o padrão de AR (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), comprimento de onda de 330 nm.



pectro UV e espectro de massa). Para o tempo de retenção, pode-se observar, na Figura 54, que a fração coletada de n° 2 apresenta em seu cromatograma exclusivamente um pico de mesmo tempo de retenção que o padrão do ácido rosmarínico para as mesmas condições de análise. Onde as análises do espectro de massa e UV comprovam a presença do AR. Na Figura 55 observa-se os espectros de massa da linha de base do cromatograma, nessa análise, composta por Metanol/Água (0.1 % HCOOH) e do padrão de AR. O pico de massa de maior intensidade relativa para o AR padrão foi de 359,08 m/z obtido em modo de ionização negativa $[M - H]^-$ (0-50 V), sendo sua massa exata 360,08452 m/z . De modo a quantificar a recuperação do AR com o uso desse sistema foi realizada uma nova extração do AR obtido pelo resíduo da ESC. Foi obtido um extrato contendo 0,174 mg/mL de AR,

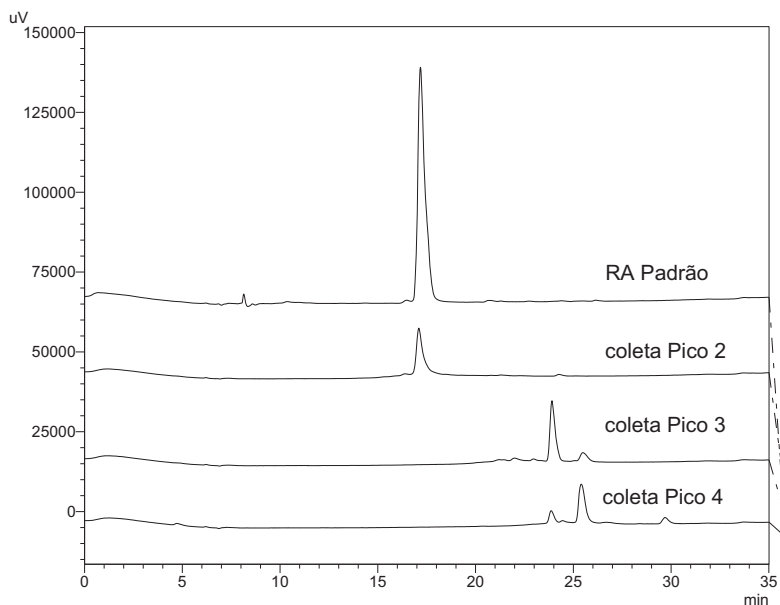
Figura 53 – Cromatograma obtido no HPLC-Preparativo Varian Dynamax, para o extrato de alecrim, comprimento de onda de 330 nm, intervalos de tempo das frações recuperados, fração 2 - 6,1 a 7,2 min; fração 3 - 8,5 a 9,1 min; fração 4 - 10,8 a 11,2 min.



de uma extração sólido-líquido (200 mL) provenientes de 10 g de alecrim seco e moído (pós ESC 150 bar) à 30 °C com auxílio do ultrassom com solvente etanol:água (30:70). Foram injetados 10 mL desse extrato e coletadas as respectivas frações. Onde para a fração 2, Figura 57, foram recuperados aproximadamente 40 mL de solução, onde foi determinado uma concentração de 40,60 µg/mL de AR, seguindo a metodologia de quantificação já utilizada. Onde aproximadamente 98 % da área obtida no cromatograma correspondem ao composto, com espectro UV e espectro de massa iguais ao padrão de AR utilizado, o que demonstra um indicativo de pureza da solução recuperada.

Dessa forma foi possível recuperar 1,624 mg dos 1,740 mg

Figura 54 – Cromatogramas (HPLC-MS) agrupados das coletas dos picos obtidos no HPLC-Preparativo, comprimento de onda de 330 nm, intervalos de tempo dos picos recuperados, pico 2 - 6,1 a 7,2 min; pico 3 - 8,5 a 9,1 min; pico 4 - 10,8 a 11,2 min.



injetados (dos 10 mL de extrato, volume de injeção), o que resulta em uma recuperação de aproximadamente 93 % do composto purificado, nessa escala, de 500× a escala analítica. Além da comprovação do composto a partir do tempo de retenção com referência ao composto padrão, espectro UV e o espectro de massa foram também utilizados na validação da separação, Figura 56. Pode-se observar os picos de massa para o ácido rosmarínico com o modo de ionização negativo $[M - H]^-$, como sendo 359,08 m/z para ambas as análises, e o mesmo está de acordo com a literatura (HOSSAIN et al., 2010). As outras frações coletadas (3 e 4) não foram identificadas.

Assim com o processo de separação em escala preparativa foi possível recuperar cerca de 93 % do composto injetado, com uma pureza de 98 %. O tempo de retenção do AR nessa escala

Figura 55 – Espectro do massa do AR Padrão e da linha de base do cromatograma obtido em HPLC-MS.

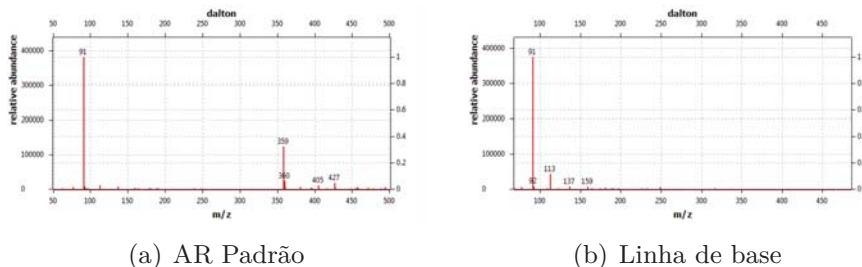
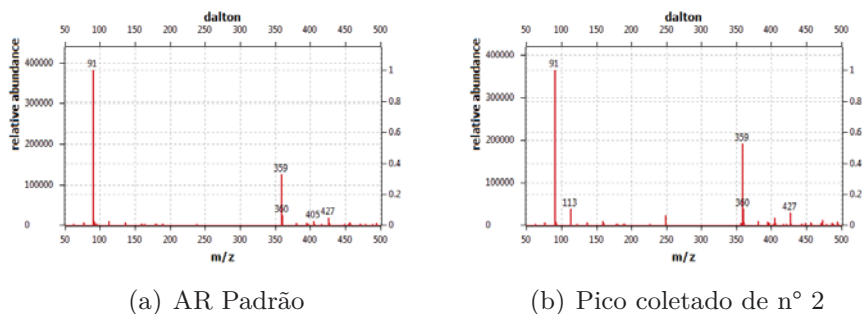


Figura 56 – Espectro do massa do AR Padrão e da linha de base do cromatograma obtido em HPLC-MS.

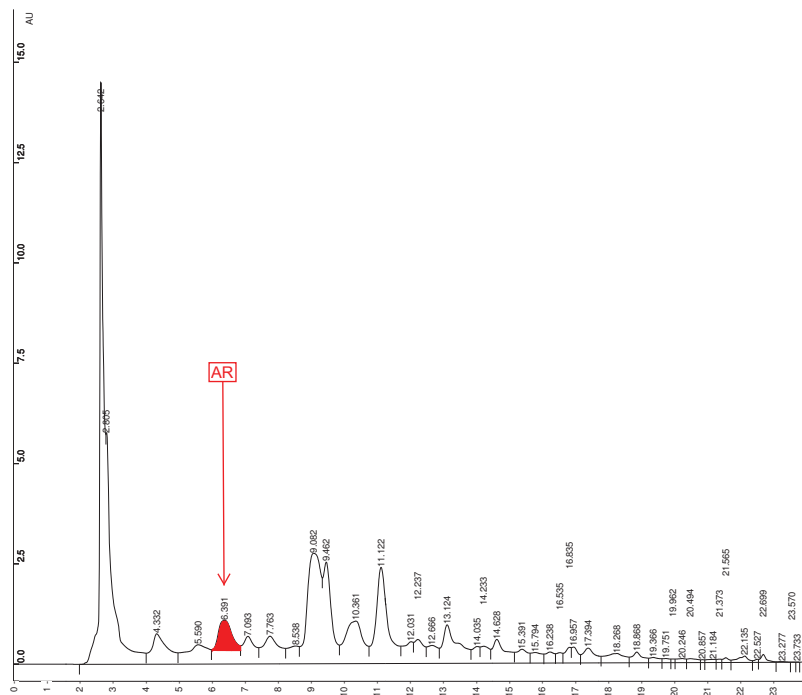


do processo de separação foi de 6,306 *min*, onde um tempo de 15 *min* de corrida é suficiente para iniciar a estabilização (5 *min*) e iniciar uma nova injeção de 10 *mL* simulando um processo semi-contínuo com injeção pulsada.

O consumo de solvente nessa etapa foi de 21 *mL/min* em gradiente de etanol:água (735 *mL* total da mistura por batelada), onde a demanda de etanol para os 35 *min* de corrida foram de aproximadamente 378 *mL*. Ou seja, para esse gradiente foi utilizado em média 10,8 *mL/min* de etanol. Esses dados serviram de base para a avaliação econômica desse processo de separação em outras escalas.

Dessa forma foi possível obter o AR purificado com uma recuperação superior a 90 % da massa injetada em uma ampliação de escala de aproximadamente 500× a escala analítica. Foi

Figura 57 – Cromatograma obtido no HPLC-Preparativo, para o extrato de alecrim, comprimento de onda de 330 nm, pico de AR detectado em 6,391 min.



produzido cerca de 1,6 mg de ácido rosmarínico com uma pureza de 98 % em uma injeção de 10 mL de extrato de alecrim, proveniente de um resíduo (10 g) da extração supercrítica de alecrim, realizada a 150 bar e 35 °C. Sendo o AR um composto de alto valor agregado com inúmeras possíveis aplicações, como já referenciado nos trabalhos científicos citados. Vale lembrar que compostos como o ácido carnósico, carnosol, ácido cafeico e rosmanol são exemplos de outros compostos que podem ser obtidos com a mesma técnica, simultaneamente à purificação do AR.

4.5.3 Considerações sobre a QUINTA etapa

Pude-se observar que para os procedimentos extrativos com etanol 30 %, a maior concentração de AR obtida foi com o auxílio do ultrassom. Porém não existe diferença estatística entre os ensaios realizados a 30 °C e 60 °C para essa condição. Isso leva à uma escolha de uma menor temperatura com base na escolha de uma extração energeticamente mais econômica.

O resíduo da extração supercrítica de alecrim pode ser utilizado como principal fonte de matéria-prima para obtenção de AR sem perda na sua qualidade (com base nas quantidades obtidas). Dessa forma o alecrim seco e desaromatizado ainda possui valor na cadeia produtiva para obtenção de um extrato antioxidante.

Foi possível verificar a ampliação de escala no processo de separação e purificação (98 %) do AR em 500× a escala analítica, com redução do tempo de retenção de 17,7 *min* para 6,3 *min*, o que também representa uma redução no consumo de solvente.

Muito pouco é comentado sobre o uso de solventes de baixo impacto ambiental ou GRAS (*Generally recognized as safe*) em cromatografia líquida (HPLC). Mesmos os métodos analíticos propostos para análise e quantificação de AR, são baseados no uso de metanol e acetonitrila, principalmente. Nesse trabalho foi desenvolvido um método de análise (escala analítica) e de separação (escala preparativa) com o uso de etanol e água como solventes. Dessa forma contribuindo para o desenvolvimento de um processo ambientalmente correto.

4.6 SEXTA etapa

4.6.1 Avaliação econômica do processo de extração supercrítica

Na avaliação econômica do processo de extração supercrítica de alecrim foram considerados os diversos custos envolvidos em uma produção industrial, desde o investimento inicial na aquisição de uma unidade até custos de utilidade (gastos energéticos), mão-de-obra, matéria-prima e custos fixos. Geralmente em uma unidade industrial é necessário levar em conta o custos com tratamentos de resíduos, porém em uma planta de extração supercrítica não é necessário, dependendo da matéria-prima a ser processada. Em geral o resíduo desse processo não representa valor comercial, e pode ser utilizado na agricultura com outro propósito (adubo) ou ainda na geração de energia (queima em caldeiras). Por outro lado o extrato é a principal fonte de renda de uma empresa de ESC. Dessa forma a quantidade de matéria-prima utilizada na avaliação econômica foi obtida segundo a equação 4.1:

$$RMC = V_{extrator} \cdot \rho_L \cdot \frac{Hr}{t_B} \cdot Vmp \quad (4.1)$$

Sendo RMC o custo total anual de matéria-prima, ρ_L a densidade do leite, Hr o número de horas operacionais por ano, t_B o tempo total da batelada e Vmp o valor da matéria-prima. A variável utilizada aqui foi o volume do extrator, conforme Tabela 20. A densidade do leite de extração utilizada foi de 379 kg.m^{-3} determinada a partir da média das densidades (ρ_a) obtidas em escala laboratorial, Tabela 26.

De modo a obter o gasto anual de CO_2 , e os custos utilitários, foi necessário estimar a vazão de CO_2 para o equipamento em escala industrial. Carvalho et al. (2005) sugeriu uma relação para a determinação da vazão necessária de CO_2 para manter o mesmo comportamento cinético entre duas unidades de ESC,

para uma dada massa de planta e geometria do extrator:

$$\frac{Q_{CO_2 1}}{Q_{CO_2 2}} = \left(\frac{F_2}{F_1} \right)^2 \cdot \frac{H_1}{H_2} \cdot \left(\frac{d_1}{d_2} \right)^3 \quad (4.2)$$

Dessa forma foi considerada a relação $H/d = 13$, baseado na unidade SFE-II com uma vazão de $3,23 \times 10^{-5} kg/s$ conforme experimentos realizados. Desse modo as vazões calculadas (Q_{CO_2}) para as unidades, na ampliação de escala, com suas respectivas quantidades de matéria-prima por batelada (**F**), estão apresentados na Tabela 61. Pode-se observar que cada unidade na ampliação de escala demanda uma quantidade diferente de matéria-prima e consequentemente uma vazão de CO_2 necessária para manter um mesmo comportamento durante a cinética de extração.

Tabela 61 – Parâmetros utilizados para scale-up, na avaliação econômica.

Volume do extrator [litros]	Matéria-prima [kg/ano]	H [m]	d [m]	H/d []	F [kg]	Q_{CO_2} [kg/h]
5	15.286	1,04	0,080	13	1,98	6,96
50	152.856	2,21	0,170	13	19,01	31,45
100	305.712	2,80	0,215	13	38,46	50,30
200	611.424	3,51	0,270	13	76,17	79,33
300	917.136	4,02	0,309	13	114,17	103,91
400	1.222.848	4,42	0,340	13	152,09	125,80
500	1.528.560	4,76	0,366	13	189,72	145,78
1000	3.057.120	5,99	0,461	13	379,12	231,28

Os custos de mão-de-obra foram estimados com base no salário mínimo nacional (2012) e seus respectivos impostos a serem recolhidos pelo empregador. Foram considerados dois funcionários por turno, operando em três turnos diários (totalizando uma operação de 24 h) por um período de 330 dias. A estimativa média para custo da mão-de-obra foi de $3,80 US\$/h$. Sendo assim para o total de 7.920 h operacionais um custo anual de $60.192 US\$/ano$.

Para o custo de utilidades na unidade de extração supercrítica de alecrim foram considerados os gastos energéticos de: aquecimento de água para os trocadores de calor utilizados para

elevar a temperatura do CO_2 e no tanque de *flash*, compressor para sistema de resfriamento e bomba de CO_2 . O custo da energia elétrica para a região de Santa Catarina (ANEEL, 2012) foi obtido como sendo em geral 312 $R\$/MWh$ e pela conversão em dólar (moeda utilizada na avaliação econômica) para 167,74 $US\$/MWh$.

O ponto inicial do processo de bombeamento do solvente inicia-se retirando o CO_2 no estado líquido proveniente de um cilindro ou tanque de estocagem, após a passagem por um sistema de resfriamento (CO_2 no estado líquido) entrando na bomba para pressurização até a pressão de extração desejada (200 bar). Após, é necessário elevar sua temperatura (até a temperatura de extração, em média 40 °C). No processo de separação o CO_2 é separado do extrato líquido, em um processo de expansão isoentálpica. Parte do fluido é vaporizada e a parte líquida (fração em equilíbrio v-l) precisa ser evaporada, onde é aquecida até atingir o seu estado gasoso. Nessa condição (baixa pressão em média 50 bar e 40 °C) o gás de extração (CO_2) não possui poder solvente e ocorre a completa separação do extrato. Na sequência do processo o solvente precisa ser condensando e armazenado até sua condição inicial para fechar o ciclo de extração. As perdas nesse processo foram consideradas de 2 % para o solvente e o gasto energético desse ciclo foi calculado.

O custo de utilidades para o presente caso se refere ao custo energético dessa unidade de extração no ciclo de operação. Os custos foram estimados e estão apresentados na Tabela 62 para cada uma das unidades (com seus respectivos volumes de extrator). Vale lembrar que cada unidade apresentou um gasto energético diferente, devido a sua capacidade operacional limitada ao tamanho do extrator e demanda de CO_2 .

Os custos da matéria-prima se referem ao solvente necessário para reposição das perdas do processo, sendo considerados 2 % e o custo da aquisição do material vegetal (alecrim seco). Cada modelo de unidade demanda uma quantidade anual diferente de matéria-prima e para cada um foi quantificado conforme a necessidade. Para o custo de material vegetal foram utilizadas diferentes referências e para cada uma destas um novo valor foi

Tabela 62 – Custo de utilidades para as unidades de extração.

Volume do extrator [litros]	Q_{CO_2} [kg/h]	Custo de utilidades (C_{UT}) [US\$/ano]
5	6,96	1.272,8
50	31,45	5.747,4
100	50,30	9.192,8
200	79,33	14.497,6
300	103,91	18.988,3
400	125,80	22.989,4
500	145,78	26.639,9
1000	231,28	42.264,1

obtido e levando em consideração no custo total. Para demonstrar o impacto dos custo no produto final na Figura 58 pode-se observar a distribuição de todos os custos envolvidos no processo de obtenção do extrato supercrítico de alecrim. Pode-se observar que o maior impacto no custo de manufatura é representado pela matéria-prima, em unidades com extratores de volume superior a 50 *litros*. No caso de uma produção em escala piloto ou laboratorial (5 *litros*) os maiores impactos no custo estão distribuídos sobre a mão-de-obra, fração do investimento inicial e a matéria-prima.

Para as unidades de fabricação Americana o custo de manufatura do extrato supercrítico de alecrim variou de 680,51 US\$/kg a 175,02 US\$/kg para a matéria-prima adquirida com preços de comercialização em pequena escala (5,90 US\$/kg), Tabela 63. Para o alecrim importado (3,00 US\$/kg) o custo do extrato variou entre 519,40 US\$/kg a 92,17 US\$/kg, para os rendimentos de extração variando entre 1,80 % a 3,50 %, nas unidades aqui referenciadas (5 a 1000 *litros*), Tabela 64.

Para as unidades de fabricação Chinesa o custo de manufatura do extrato supercrítico de alecrim variou de 613,25 US\$/kg a 173,21 US\$/kg para a matéria-prima adquirida com preços de comercialização em pequena escala (5,90 US\$/kg), Tabela 65. Para o alecrim importado (3,00 US\$/kg) o custo do extrato variou entre 452,13 US\$/kg a 90,36 US\$/kg, para os rendimentos de extração entre 1,80 % a 3,50 %, nas unidades aqui referenciadas (5 a 1000 *litros*), Tabela 66.

Figura 58 – Distribuição dos custos integrantes no custo de manufatura do extrato de alecrim pelas respectivas unidades de extração do mercado Americano, onde FC é o custo fixo, GC são custos gerais, UC é o custo das utilidades, LC é custo da mão-de-obra, RMC é o custo da matéria-prima (baseado no valor de aquisição, V_{mp} , de 5,90 $US\$/kg$) e CLC é custo respectivo a reposição de CO_2 .

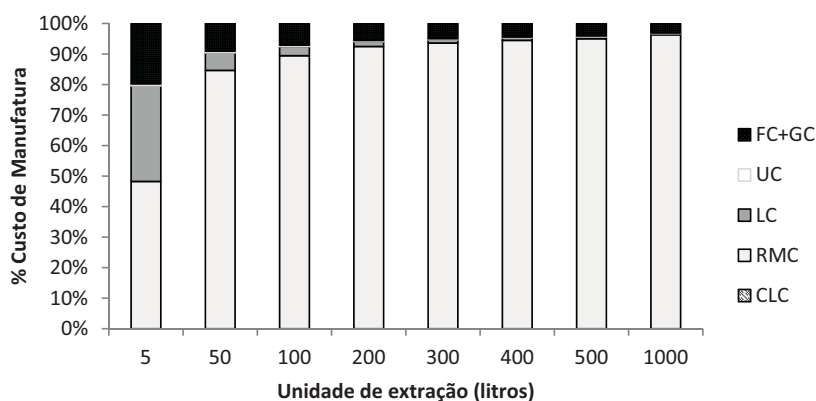


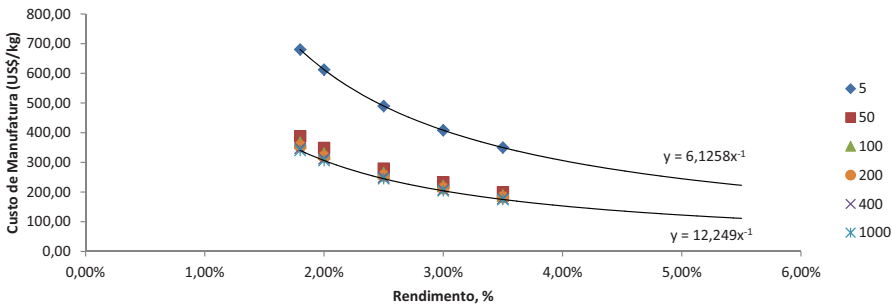
Tabela 63 – Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 5,90 $US\$/kg$ para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Americana.

Volume do extrator [litros]	COM ($V_{mp} = 5,90 \text{ } US\$/kg$)				
	1,80% [$US\$/kg$]	2,00% [$US\$/kg$]	2,50% [$US\$/kg$]	3,00% [$US\$/kg$]	3,50% [$US\$/kg$]
5	680,51	612,46	489,97	408,31	349,98
50	387,43	348,69	278,95	232,46	199,25
100	366,64	329,98	263,98	219,99	188,56
200	354,52	319,06	255,25	212,71	182,32
300	350,30	315,27	252,22	210,18	180,16
400	347,09	312,38	249,90	208,25	178,50
500	345,17	310,65	248,52	207,10	177,51
1000	340,32	306,29	245,03	204,19	175,02

Tabela 64 – Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 3,00 *US\$/kg* para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Americana.

Volume do extrator[litros]	COM (Vmp = 3,00 <i>US\$/kg</i>)				
	1,80% [<i>US\$/kg</i>]	2,00% [<i>US\$/kg</i>]	2,50% [<i>US\$/kg</i>]	3,00% [<i>US\$/kg</i>]	3,50% [<i>US\$/kg</i>]
5	519,40	467,46	373,97	311,64	267,12
50	226,32	203,69	162,95	135,79	116,39
100	205,53	184,98	147,98	123,32	105,70
200	193,40	174,06	139,25	116,04	99,47
300	189,19	170,27	136,22	113,52	97,30
400	185,98	167,38	133,90	111,59	95,64
500	184,05	165,65	132,52	110,43	94,66
1000	179,21	161,29	129,03	107,53	92,17

Figura 59 – Previsão do custo de manufatura do extrato de alecrim (Vmp = 5,90 *US\$/kg*) sobre o rendimento (%) do processo em cada uma das unidades (5 a 1000 *litros*) .



Como pode-se observar na Figura 58 o impacto do custo da unidade industrial representa um parcela menor no custo de manufatura conforme o aumento da escala de produção. Segundo a Figura 59 observa-se uma alteração na ordem de grandeza do custo de manufatura quando comparado uma unidade de 5 *L* com as restantes. As unidades de 50 *L* a 1000 *L* apresentam uma previsão do custo de manufatura muito próximo.

O preço médio do óleo essencial de alecrim comercializado varia em média de 60 *US\$/kg* a 200 *US\$/kg* (PEREIRA; MEIRELES, 2007; SHARIATY-NIASSAR et al., 2009) dependendo da região

Tabela 65 – Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 5,90 $US\$/kg$ para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Chinesa.

Volume do extrator[litros]	COM ($V_{mp} = 5,90 \text{ } US\$/kg$)				
	1,80% [$US\$/kg$]	2,00% [$US\$/kg$]	2,50% [$US\$/kg$]	3,00% [$US\$/kg$]	3,50% [$US\$/kg$]
5	613,25	551,92	441,54	367,95	315,38
50	373,41	336,07	268,86	224,05	192,04
100	356,25	320,62	256,50	213,75	183,21
200	346,20	311,58	249,27	207,72	178,05
300	342,72	308,45	246,76	205,63	176,25
400	340,51	306,46	245,17	204,31	175,12
500	339,19	305,28	244,22	203,52	174,44
1000	336,81	303,13	242,50	202,08	173,21

Tabela 66 – Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 3,00 $US\$/kg$ para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Chinesa.

Volume do extrator[litros]	COM ($V_{mp} = 3,00 \text{ } US\$/kg$)				
	1,80% [$US\$/kg$]	2,00% [$US\$/kg$]	2,50% [$US\$/kg$]	3,00% [$US\$/kg$]	3,50% [$US\$/kg$]
5	452,13	406,92	325,54	271,28	232,53
50	212,30	191,07	152,86	127,38	109,18
100	195,13	175,62	140,50	117,08	100,36
200	185,09	166,58	133,27	111,06	95,19
300	181,61	163,45	130,76	108,96	93,40
400	179,40	161,46	129,17	107,64	92,26
500	178,08	160,28	128,22	106,85	91,59
1000	175,69	158,13	126,50	105,42	90,36

e do método de extração. [Pereira e Meireles \(2007\)](#) estimou o custo de manufatura do extrato supercrítico de alecrim nas condições de 300 bar e 40 °C (unidade de 400 *litros*, investimento $US\$$ 2 milhões), com rendimento de 5,0 % como sendo 30,29 $US\$/kg$ ($V_{mp} = 0,28 \text{ } US\$/kg$), e [Shariaty-Niassar et al. \(2009\)](#) obtiveram um custo aproximado de 72,74 $US\$/kg$, nas mesmas condições operacionais (unidade de 200 *litros*, investimento $US\$$ 1,8 milhão) com um rendimento de 1,80 % ($V_{mp} = 0,40 \text{ } US\$/kg$). Levando-se em consideração que é possível obter um preço menor na aquisição da matéria-prima aqui no Brasil, através de compras programadas, em grandes quantidades e ainda diretamente

da fonte produtora, uma nova comparação foi realizada. Dessa forma, com um valor estimado de aquisição da matéria-prima (V_{mp}) como sendo de 1,50 $US\$/kg$, cerca de 4x superior ao referenciado nos artigos. Porém vale enfatizar que esse não é o valor real, esse podendo ser ainda menor. Sendo assim obteve-se a Tabela 67, onde o valores variam de 436,07 $US\$/kg$ a 49,31 $US\$/kg$ para as unidades de extração (Americana), com estimativa de rendimento de 1,80 % a 3,50 %.

Tabela 67 – Custo de manufatura do extrato de alecrim, baseado no valor da matéria-prima de 3,00 $US\$/kg$ para cada unidade, com valores de rendimento de 1,80 % a 3,50 % - Unidade Americana.

Volume do extrator[litros]	COM ($V_{mp} = 1,50 \text{ } US\$/kg$)				
	1,80% [$US\$/kg$]	2,00% [$US\$/kg$]	2,50% [$US\$/kg$]	3,00% [$US\$/kg$]	3,50% [$US\$/kg$]
5	436,07	392,46	313,97	261,64	224,26
50	142,99	128,69	102,95	85,79	73,54
100	122,20	109,98	87,98	73,32	62,84
200	110,07	99,06	79,25	66,04	56,61
300	105,86	95,27	76,22	63,52	54,44
400	102,64	92,38	73,90	61,59	52,79
500	100,72	90,65	72,52	60,43	51,80
1000	95,88	86,29	69,03	57,53	49,31

Pode-se concluir a grande importância na aquisição de uma matéria-prima a um custo mais acessível. É entendido que, a prática desse tipo de indústria é a de plantio e posterior extração, onde o seu cultivo torna a matéria-prima extremamente acessível ao beneficiamento. Não foram levantados os custos de produção por hectare dessa matriz vegetal. Porém é possível obter um cultivo de RO, com uma massa folhar seca, variando entre 3,95 e 8,39 t/ha , a cada 60 e 120 dias respectivamente, após o início do período de colheita (MAY et al., 2010). Sendo assim para suprir a demanda anual de matriz vegetal (supondo o extrator de 1000 L) seriam necessários em média 122 *hectares* plantados (3 colheitas por ano).

De um forma geral a obtenção de um produto de alto valor agregado (extrato supercrítico de alecrim, como agente antimicrobiano) se torna vantajoso quando toda a cadeia produtiva é gerenciada para um único fim, nesse caso, um plantio e manejo

para sua posterior extração *in loco*.

4.6.2 Avaliação econômica do processo de extração e separação do ácido rosmarínico

Para a separação de um composto utilizando um método cromatográfico em escala piloto ou comercial, se inicia com dados obtidos no processo de separação em escala analítica. Um *scale-up* foi realizado transpondo-se dados da metodologia desenvolvida no processo de menor escala para um de uma escala apropriada às necessidades produtivas. Como estimativa desses parâmetros iniciou-se verificando a quantidade necessária a ser separada. Como o processo anterior, de extração supercrítica gera um resíduo de matéria-prima, comumente não utilizado para fins mais nobres, fez-se uso desse resíduo (alecrim desaromatizado) como matéria-prima na primeira etapa de obtenção do composto a ser purificado. Pelo fato da matéria-prima ser um resíduo de uma extração anterior, essa, por sua vez se encontra em um estado mais limpo, no que se refere a compostos não desejáveis nessa etapa.

A capacidade dos sistemas de separação cromatográfica em batelada é reduzida, comparada ao montante de composto que pode ser extraído com a matéria-prima utilizada e já referenciada na seção 4.6.1. Sendo assim o montante de matéria-prima (resíduo da extração supercrítica) é suficiente para atender os requisitos dos diferentes cenários da avaliação.

Basicamente o processo compreende na obtenção dos compostos de interesse a partir da matriz-vegetal, por meio de uma extração sólido-líquido, subsequente concentração desse extrato, utilizando evaporadores, seguido de uma filtração e injeção em um sistema de separação por cromatografia. Sendo a etapa final a retirada dos solventes utilizados na separação pelo uso de liofilizadores.

Na avaliação econômica do processo de extração supercrítica verificou-se diferentes unidades extrativas, sendo a de menor custo de manufatura a unidade de maior volume. Sendo assim, optou-se por utilizar a massa de planta dessa unidade, que utiliza

3.057.120 kg/ano, ou seja 386 kg/batelada. A determinação da quantidade de solvente para extração depende principalmente do equipamento a ser utilizado, os equipamentos aplicáveis a esse propósito pode ser, tambor rotativo, reator com agitação ou sistema de extração em baixa pressão (9 bar) que utiliza o princípio de Naviglio (CUTILLO et al., 2006), dentre outros. Para as extrações em escala piloto e comercial optou-se pelo equipamento, reator com agitação, devido a sua facilidade operacional, deve-se utilizar no mínimo três vezes a massa de solvente em relação à matéria-prima, dessa forma em média 1 ton de vegetal utilizado requisitaria 3 ton de solvente. Sendo assim 0,9 ton de etanol e o restante (2,1 ton) de água. O sistema de extração necessita de um aquecimento para manter a temperatura da extração. Sendo assim, para esse processo faz-se necessário um tanque de 5 m³ (ou 2 de 2,5 m³) para a extração que dura em torno de 30 min, uma centrífuga para a retirada do excesso de solvente, e um sistema de evaporação para concentração do extrato e recuperação dos solventes.

Após o processo de extração sólido-líquido o extrato é submetido a um processo de pré-filtração de sólidos finos e em seguida submetido ao processo de concentração por evaporação e recuperação de solvente. Os custos energéticos desse processo foram estimados. Foram avaliadas nessa etapa os custos de recuperação, sem a comparação entre o benefício de aquisição de solvente *versus* o custo de reciclagem, por entender que essa deva ser uma prática comum em processos que visam etapas produtivas ambientalmente corretas. Após o processo de centrifugação a massa vegetal úmida (40 %) é enviada à queima para geração de energia em caldeira, onde essa energia é reintegrada no processo, para tanto o poder calorífico desse resíduo foi estimado com base na literatura.

Para concentração do extrato foi avaliado o consumo energético de evaporadores de múltiplo efeito, por serem mais eficientes em questão de consumo de vapor. O sistema de evaporação de múltiplo efeito foi simulado utilizando software *Hysys*[®], onde o consumo de vapor para concentração do extrato foi determinado.

Com base no processo de evaporação de solvente para con-

centração do extrato, três efeitos foram considerados, sendo a corrente de alimentação de 0,27% de AR no extrato (baseado nos dados obtidos experimentalmente) sendo concentrado a 10,2 %. Visando aumentar a eficiência energética do sistema, foi reintegrado a energia do último evaporador (vapor de saída do terceiro efeito) para aumentar a temperatura da alimentação de entrada de 30 °C para 80 °C. Dessa forma o consumo global de vapor de caldeira com a reintegração energética foi de 496,8 kg/h, para uma alimentação de 1.500 kg/h de extrato. Em processos de evaporação o custo principal é o vapor de água consumido (FOUST et al., 1982).

Para um caldeira com capacidade para produzir 550 kg/h de vapor são necessários em média 320.000 kcal/h de energia, considerando a alimentação de água na caldeira a 80 °C. Sendo a caldeira estimada com um rendimento térmico de 55 % (conforme os fabricantes), e sendo a capacidade calorífica inferior das folhas secas de alecrim com umidade definida em 40 % (resíduo da extração sólido-líquido) como hipótese de cálculo, em média 1.500 kcal/kg, baseado em valores da literatura para folhas secas e verde de palhas de cana-de-açúcar, bagaço e folhas de pinus. Dessa forma a quantidade necessária de resíduo de biomassa para alimentação da caldeira para a produção de 550 kg/h de vapor foi de aproximadamente 390 kg/h de resíduo. Considerando perdas de até 10 % nesse processo de utilização de biomassa, os custos da concentração do extrato de 0,27 % para 10,2 % se resumem a um consumo de cerca de 16 kg/h (poder calorífico inferior de 9.502 kcal/kg) de óleo combustível (0,45 US\$/L) para suprir possíveis variações na alimentação da caldeira.

A Tabela 68 contém as condições operacionais para cada um dos cenários estimados. Para a produção de pequenas quantidades de AR, em escala analítica, por eluição ou cromatografia pulsada, optou-se pelo uso de uma coluna analítica, com a injeção "sobrecarregada" (em termos de análise), ou seja em concentrações superiores as normalmente utilizada em escala analítica. Manteve-se a mesma concentração de extrato na alimentação (100 g/L), salvo para o modo de operação SMB que suporta concentração mais elevadas na injeção. A pureza de recuperação

utilizada no cálculo como a esperada foi de 93 % (menor do que a obtida experimentalmente em escala preparativa), abaixo daquelas possivelmente obtidas com um processo cromatográfico (98 %), de acordo com experimentos e pela literatura. Essa opção visa avaliar um processo mais realístico com variações intrínsecas dos processos industriais.

Os custos diretos constituintes do custo de manufatura (COM) foram determinados e estão apresentados na Tabela 69. Pode se observar a redução no custo de manufatura com o aumento de escala em HPLC-batelada, ainda, sendo o modo de operação em SMB o mais econômico (21,66 *US\$/kg*), já referenciado em diversos trabalhos, (PEPER; JOHANNSEN; BRUNNER, 2007; TOUMI et al., 2007; KASPEREIT et al., 2005; JUPKE; EP-PING; SCHMIDT-TRAUB, 2002; PYNNONEN, 1998; NOVASEP, 2011; SETHI; WIESNER, 2000; VANNESTE et al., 2011). Para os cenários avaliados, nas condições citadas, os valores do *kg* de AR produzido são bastante inferiores aos valores comercializados. O valor da embalagem de 10 *mg* de AR obtido por *Rosmarinus officinalis*, com 98 % de pureza custa para o consumidor final em média 64 *US\$* e 191,52 *US\$* para a embalagem de 50 *mg*, ou seja 6,40 *US\$/mg* (6.398.305,08 *US\$/kg*) e 3,83 *US\$/mg* (3.830.508,47 *US\$/kg*) respectivamente (valores obtidos na revenda da Sigma Aldrich Brasil - 2012). Para o AR (96 % de pureza), embalagem de 5 *g* o valor obtido foi de 437,72 *US\$* ou seja 0,09 *US\$/mg* (87.542,37 *US\$/kg*), próximo (9 % maior) ao COM obtido na separação em escala analítica (79.733,18 *US\$/kg*). Porém não foi possível obter valores comercialmente praticados para as quantidades superiores (em *kg*) a essas citadas.

Pode-se observar na Figura 60 que o custo de manufatura do AR em escala analítica é distribuído entre os custos indiretos (fixos e gerais), e diretos, como matéria-prima (solventes e fase estacionária) e mão-de-obra. Com o aumento da escala para os processos em HPLC-batelada, observa-se que os custos dominantes se voltam para a matéria-prima (solventes e fase estacionária). Para o processo em modo SMB o COM é dominado pelos custos de utilidades além do custo de matéria-prima.

É importante salientar que a estimativa econômica do custo

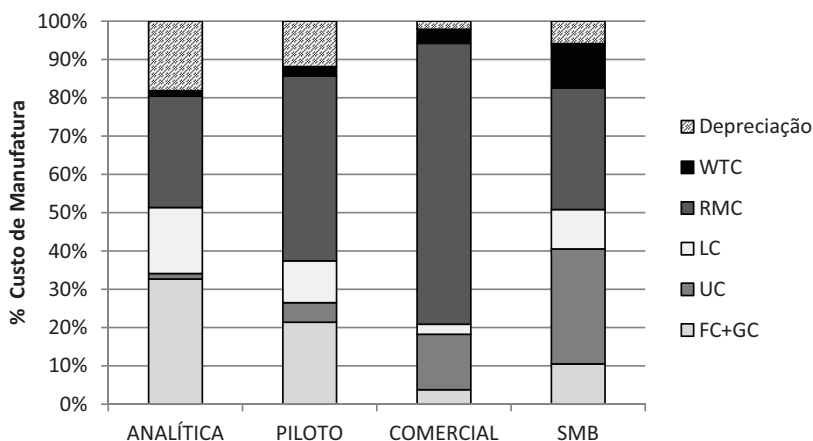
Tabela 68 – Condições e bases econômicas para o processo de separação nas escalas.

Condições do processo	ANALITICA	PILOTO	COMERCIAL	SMB	unidades
Concentração na alimentação	100	100	100	750	[g/L]
Pureza da alimentação	45	45	45	45	[%]
Recuperação	93	93	93	93	[%]
Horas diárias	24	24	24	24	[h]
Volume de injeção	0,715	71,5	7.150	-	[mL]
Período de injeção	15	15	15	-	[min]
Vazão de solvente	1,0	100,0	10.000,0	-	[mL/min]
Vazão de alimentação	-	-	-	1.000,0	[mL/min]

Tabela 69 – Custos diretos do processo de separação nos diferentes cenários.

	Custos diretos			
	ANALÍTICA	PILOTO	COMERCIAL	SMB
Invest. inicial (FCI)	100.000,00	500.000,00	1.000.000,00	1.400.000,00
Custos				[US\$]
fixos e gerais (FC+GC)	18.000,00	90.000,00	180.000,00	252.000,00
utilidades (UC)	794,88	21.575,31	685.000,00	720.000,00
mão de obra (LC)	9.504,00	45.936,00	123.552,00	247.104,00
matéria-prima (RMC)	15.996,64	203.093,67	3.475.886,08	761.165,20
tratamento de resíduos (WTC)	799,83	10.154,68	173.794,30	277.992,00
depreciação (10 % do FCI)	10.000,00	50.000,00	100.000,00	140.000,00
COM do AR (anual)	75.583,29	554.238,39	5.948.953,84	3.230.357,28
Produção de AR	0,95	94,80	9.479,53	149.153,40
COM do AR (kg)	79.733,18	5.846,69	627,56	21,66
				[US\$/kg]

Figura 60 – Distribuição dos custos integrantes no custo de manufatura do ácido rosmarínico (AR) pelas respectivas unidades de separação, onde FC é o custo fixo, GC são custos gerais, UC é o custo das utilidades, LC é custo da mão-de-obra, RMC é o custo da matéria-prima (solventes e fase estacionária) e WTC é custo do tratamento de resíduos.



de manufatura utilizado proposto por Turton (2012), equação (3.20) englobou os custos indiretos, fixos e gerais, e diretos, onde taxa de depreciação (10 % do FCI) foi agregada ao custo final. Essa análise ainda serve, portanto, para trazer atenção ao potencial comercial dos processos químicos que podem ser desenvolvidos no país, com sua possível rentabilidade, embora seja necessário um mercado com interesse no produto. Vale ainda colocar em evidência o potencial como fármaco e como aditivo em alimentos, dos produtos obtidos nesses processos, esses já muito estudado por diversos autores já citados nesse trabalho. Cabe ainda afirmar que a aproximação do COM é válida dentro de uma perspectiva industrial, onde se existe uma estrutura já está montada e esse processo é passível de ser estruturado dentro de uma cadeia comercial. Lembrando que a partir dessa análise cabe ainda medidas de estudo de otimização, que veem ao encontro do desenvolvimento de um processo economicamente viável e competitivo internacionalmente.

Dessa forma, a união de dois processos extrativos (ESC e

ESL) seguidos de um processo de separação (cromatográfico) resulta em diferentes produtos (extrato SC, extrato alcoólico e AR) com aplicações já testadas e de alto potencial científico. Sabe-se que ainda resta um longo caminho de pesquisa e aprimoramento para a colocação desses produtos em um mercado, porém os indicativos são claros no que tange a sua viabilidade técnico-econômica. Ainda, durante o processo de separação cromatográfica, outros produtos podem ser obtidos, sem ônus financeiro, compostos como o ácido carnósico, carnosol dentre outros, também antioxidantes, que podem ser separados simultaneamente no mesmo processo, com apenas uma escolha mais apropriada do gradiente e tempo de coleta. Ou seja, embora o processo de separação tenha focado um único composto, o mesmo processo serve para outros do mesmo espectro e polaridade, presentes nessa matriz vegetal, como é o caso do ácido carnósico.

4.6.3 Desenvolvimento do processo de separação de compostos ativos

Com a avaliação de cada um dos processos, envolvendo extração supercrítica (ESC), extração sólido-líquido (ESL) e subsequente uso de técnicas de separação cromatográfica, o esquema básico do processo visando obter os compostos bioativos do alecrim foi estruturado. Na Figura 61, é apresentado o diagrama de fluxo do processo, de forma básica, com o acoplamento dos distintos procedimentos avaliados para obtenção dos compostos bioativos do alecrim, dividido em dois grupos bem definidos, bioativos com propriedades antioxidante (AR ou extrato concentrado) e antimicrobiana (extrato SC). Como produto com propriedade antimicrobiana, testada em alimentos, o extrato supercrítico é o primeiro da cadeia produtiva a ser manufaturado. O mesmo pode ser fracionado, atingindo a especificação desejada (clientes) quando necessário um extrato com diferente qualidade ou aroma predominante. Seguido do extrato hidro-alcoólico, onde estão presentes os compostos antioxidantes, no qual é submetido ao processo de separação cromatográfica, de onde é purificado o ácido rosmarínico, e ainda possivelmente outros compostos po-

torna um benefício, necessário para uma maior repetibilidade do processo.

Com o resíduo da extração obteve-se um extrato rico em compostos antioxidantes (sem a presença de compostos terpênicos) como resultado de uma extração com solventes de uso alimentar (baixa concentração de etanol 30 %). E a partir desse extrato foi obtido um composto purificado de alto valor agregado com inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos. O balanço econômico desses processos demonstraram a real possibilidade de transformar esses grupos de compostos obtidos em produtos comercialmente viáveis no ponto de vista econômico, e tecnologicamente prontos no ponto de vista de suas possíveis aplicações. Lembrando ainda que com a técnica do uso de amostragem de *headspace* das folhas da planta ainda fresca, pode servir de controle de qualidade na escolha de um melhor momento de colheita, de forma rápida e eficiente, aliando assim um controle bem fundamentado de toda uma cadeia produtiva baseada na obtenção de compostos bioativos do *Rosmarinus officinalis* oriundos de regiões do país.

4.6.4 Considerações sobre a SEXTA etapa

A metodologia descrita para estimativa do custo de manufatura dos produtos, extrato supercrítico de alecrim e do ácido rosmarínico demonstram a viabilidade econômica dos processos nas condições operacionais propostas, sendo os custos de produção inferiores aos já comercializados.

Para a extração supercrítica é fundamental uma estrutura de fornecimento da matéria-prima à um preço compatível com um COM que permita a sua competitividade no mercado. Um sistema de integração rural associativa com os produtores, com compras programada de toda a produção seria o suficiente para reduzir os custos com a matriz vegetal. Isso levaria à um outro estudo de manejo da mesma para se certificar das possibilidades na utilização desse material vegetal na região à qual a unidade industrial deve-se localizar.

No processo de separação do AR, a unidade deve-se si-

tuar preferencialmente em conjunto com a unidade de ESC, como proposto. Embora seja possível receber somente o extrato hidroalcoólico (menor volume) para posterior purificação do AR. Pôde-se verificar que os COM do AR obtidos com o processo de purificação em todas as escalas são inferiores aos comercializados, o que valida o processo mesmo em escala considerada como analítica, nos cenários avaliados, com as condições operacionais propostas.

Dessa forma, no conjunto, o beneficiamento e a obtenção dos compostos bioativos do alecrim se mostram economicamente e tecnologicamente viáveis, dentro das condições aqui propostas. Servindo como estímulo ao desenvolvimento industrial para obtenção de produtos de alto valor agregado. Ainda, a comunidade acadêmica muito tem feito na pesquisa das propriedades dessa planta (alecrim) o que serve de base para o desenvolvimento de novas aplicações para seus produtos e derivados naturais.

Conclusão

Os ensaios de extração supercrítica mostraram maior rendimento frente à extração por hidrodestilação, e com diferença na sua composição química. Com análise de MEV pôde-se caracterizar a localização do óleo essencial na matriz vegetal, na região abaxial da folha de alecrim, nos tricomas glandulares pel-tados, onde foi possível determinar o tamanho dessa estrutura, (45 a 60) μm e que a redução do tamanho de partícula pode influenciar positivamente no rendimento das extrações. A solubilidade do extrato supercrítico (150 *bar* e 35 °C) aumentou com a redução da vazão de solvente, CO₂ (0,99 a 0,45) *mL/min*, pelo consequente aumento no tempo de contato com o soluto nas condições avaliadas.

O extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtido por extração supercrítica, apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas testadas, especialmente o *S.aureus* e a *L.monocytogenes*, e contra bactérias lácticas e psicrofílos. Os resultados obtidos indicam uma possível aplicação do extrato de alecrim como conservante natural em alimentos embutidos cárneos. Isto porque, neste tipo de produto especificamente, o aroma e sabor conferidos pelo extrato podem ser desejáveis. O extrato de alecrim também proporcionou o aumento da vida de prateleira do presunto cozido fatiado embalado a vácuo em 33 %, armazenado a 7 °C e 12 °C, considerado temperatura de abuso.

As análises de *headspace* das amostras de folhas (fresca, seca, seca e moída, e pós extração) e dos extratos, apresentaram resultados interessantes quanto à composição química presente na fase vapor, das amostras em diferentes estados (líquido e sólido). Pôde-se observar indicativos de quais são os compostos relevantes no aroma característico das amostras, e as variações de suas quantidades devido ao tratamento (como no caso da secagem). A concentração dos compostos na fase vapor das folhas frescas, recém colhidas é superior aquelas com tratamento de secagem.

O α -pineno (180,55 μg) e o β -myrceno foram os compostos de maior expressão no cromatograma, seguidos do eucaliptol (77,80 μg), cânfora (25,89 μg) e canfeno. Essa técnica pode ser expandida à um controle de qualidade no cultivo de matriz vegetais, visando otimizar a colheita delas em época ou período onde os compostos apresentem um maior concentração. E isso pode ser feito de forma rápida e dinâmica, sem o custo de procedimentos de extração e com uma quantidade bastante pequena de amostra. Dessa forma em um processo de obtenção desses compostos bioativos (agentes antimicrobianos) essa técnica seria útil no monitoramento da qualidade do vegetal, visando encontrar a melhor época e período para sua colheita.

Com o fracionamento foi possível obter extratos com diferentes composições químicas, de forma controlada, onde essas variações são interessantes em diferentes aplicações, como aromatização de produtos alimentícios. Ou ainda aplicação desses extratos fracionados na indústria de perfumes, onde as diferenças na concentração dos compostos majoritários pode levar à uma combinação de aromas diferenciado. Esses extratos podem apresentar diferentes capacidades antimicrobianas devido a sua composição química, podendo esses serem adequados à diferentes aplicações. Ainda com propriedades interessantes para a indústria de fármacos. Os dados obtidos com o fracionamento em rampa de pressão demonstram a possibilidade de se obter frações de monoterpenos oxigenados, sem a presença dos monoterpenos. O que demonstra a capacidade de se obter grupos de compostos com maior expressão em cada uma das frações. Com o uso dos separadores ciclônicos foi possível demonstrar outras possíveis aplicações dos extratos obtidos, como a implementação de extratos com maior concentração de eucaliptol e cânfora, dois dos compostos com atividade antimicrobiana já comprovada. O extrato com essa característica foi predominante nos recuperados etanólicos do separador 3 (20 *bar*), em quase todas as condições experimentais de extração. Ainda seria possível combinar os dois métodos de fracionamento visando aprimorar ainda mais a obtenção dos grupos bioativos de preferência, com o uso de uma unidade automatizada, visto que essa possibilidade já é uma rea-

lidade em operações de escala industrial, dessa forma o processo de fracionamento pode ter sua eficiência aprimorada. O aproveitamento no resíduo (*Rosmarinus officinalis*) da extração supercrítica na obtenção de compostos antioxidantes por técnicas de extração utilizando solventes GRAS (etanol e água), mostrou-se viável tecnologicamente. Pôde-se observar que para os procedimentos extrativos com etanol 30 %, a maior concentração de AR obtida foi com o auxílio do ultrassom. Porém não existiu diferença estatística entre os ensaios realizados a 30 °C e 60 °C para essa condição. Isso nos leva à uma escolha de uma menor temperatura com base na opção de uma extração mais econômica. O resíduo da extração supercrítica de alecrim pode ser utilizado como principal fonte de matéria-prima para obtenção de AR sem perda na sua qualidade (com base nas quantidades obtidas), visto que a ESC é uma técnica que pode ser utilizada mesmo em compostos termolábeis. Dessa forma o alecrim seco e desaromatizado ainda possui valor na cadeia produtiva para obtenção de um extrato antioxidante e conseqüentemente compostos de alto valor agregado. Foi possível verificar a ampliação de escala no processo de separação e purificação (98 %) do AR em 500× a escala analítica, com redução do tempo de retenção de 17,7 *min* para 6,3 *min* na obtenção da fração do composto alvo, o que também representou uma redução no consumo de solvente e maior produtividade. Foi desenvolvido um método de separação e purificação em escala analítica e preparativa (500x) do AR utilizando solventes considerados GRAS (etanol e água).

Muito pouco é comentado sobre o uso de solventes de baixo impacto ambiental ou GRAS (*Generally recognized as safe*) em cromatografia líquida (HPLC). Mesmos os métodos analíticos propostos para análise e quantificação de AR, são baseados no uso de metanol e acetonitrila, principalmente. Nesse trabalho foi desenvolvido um método de análise (escala analítica) e de separação (escala preparativa) com o uso de etanol, e água como solventes. Dessa forma contribuindo para o desenvolvimento de um processo ambientalmente correto. Sendo ainda os possíveis resíduos no produto final não tóxicos (comparado ao metanol e acetonitrila), o que em muito colabora com a aplicação em ali-

mentos ou fármacos.

A análise econômica dos processos de obtenção e purificação dos compostos bioativos demonstram sua viabilidade, dentro das condições operacionais propostas. Ainda é possível otimizar o processo visando um melhor rendimento dos processos. Para o processo de obtenção e agentes antimicrobianos, por extração supercrítica, é mais interessante uma estrutura de fornecimento da matéria-prima regular, ou próprio plantio, para que o COM permita a sua competitividade no mercado internacional.

Os valores do COM do extrato supercrítico de alecrim obtidos na análise demonstram viabilidade econômica na implementação dessa tecnologia, sendo os valores obtidos inferiores (54,44 a 49,31 $US\$/kg$, para extratores de 300 a 1000 L) aos comercializados 60 a 200 $US\$/kg$, sendo necessário um rendimento médio de 3,5 % ($V_{mp} = 1,50 US\$/kg$). A redução no custo da matéria-prima levaria à uma redução ainda maior no COM, visto que esse custo representa mais que 60 % do total. A otimização do processo, com aumento no rendimento da extração levaria a um aumento de produtividade e consequente redução do custo final.

No processo de purificação do AR, por cromatografia líquida (HPLC), os menores custos específicos ocorrem com a ampliação da escala a partir de 100× a escala analítica. Onde os custos encontrados são inferiores aos comercializados atualmente, com as condições operacionais propostas. O custo específico do AR obtido com o SMB na avaliação, demonstra a necessidade de um maior aprofundamento técnico sobre esses processos de separação, visto que são especialmente atrativos economicamente.

4.7 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar outras condições operacionais de fracionamento com o uso de separadores ciclônicos em uma unidade automatizada;
- Otimizar a extração dos compostos antioxidantes em batelada, tanto em modo normal como auxiliada por ultrassom;

- Propor um novo modelo de extração dos compostos antioxidantes em modo contínuo;
- Avaliar a atividade antioxidante do AR purificado em alimentos;
- Avaliar a atividade antitumoral e anti-inflamatória do AR purificado;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos de alecrim obtidos por fracionamento em rampa e com o uso de separadores ciclônicos e comparar;
- Estudar o processo de purificação do AR em leito móvel simulado (SMB) em escala preparativa;
- Estudar o empacotamento de colunas em escala piloto e verificar sua performance na separação do AR e outros compostos do extrato de alecrim;
- Estudar a estabilidade do AR separado por processos cromatográficos.

Referências

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, v. 111, n. 2, p. 343–350, jul. 2012. ISSN 02608774. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012>. Citado na página 94.

ACCEL. Cost Estimate Classification System: As Applied in Engineering. *AACE RP No. 18R-97*, p. 6, 2003. Citado na página 135.

ACKLEY, M. W.; REGE, S. U.; SAXENA, H. Application of natural zeolites in the purification and separation of gases. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 61, n. 1–3, p. 25–42, jul. 2003. ISSN 1387-1811. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387181103003536>. Citado na página 74.

ADACHI, Y.; LU, B. C. Y. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene. *Fluid Phase Equilibria*, v. 14, p. 147–156, 1983. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG2-43RDFNN-DN/2-/ebee294aef9b0fa1a8a5efb002cb50cf>. Citado na página 52.

AKGÜN, M.; AKGÜN, N. A.; DINCER, S. Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 15, n. 2, p. 125–117, 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446\(99\)00006-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446(99)00006-6). Citado 2 vezes nas páginas 56 e 57.

ANEEL. *ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica*. 2012. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/tarifaAplicada/index.cfm>. Citado na página 209.

ANGIONI, A. et al. chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3530–5, jun. 2004. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161226>>. Citado 4 vezes nas páginas 41, 42, 84 e 90.

ANTON, K.; BERGER, C. *Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns*. New York, NY: CRC Press, 1997. Citado 2 vezes nas páginas 51 e 60.

AREIAS, F. et al. Flavonoids and phenolic acids of sage: influence of some agricultural factors. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 48, n. 12, p. 6081–4, dez. 2000. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141272>>. Citado na página 127.

ARUOMA, O. I. et al. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 1880–1885, nov. 1993. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00035a014>>. Citado 3 vezes nas páginas 83, 89 e 90.

ARVANITOYANNIS, I. S.; KASSAVETI, A. 8 - Olive Oil Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste. In: ARVANITOYANNIS, I. S.; DR; Ph.D.A2 - Ioannis S. Arvanitoyannis Ph.D. BT - Waste Management for the Food Industries, D. (Ed.). Amsterdam: Academic Press, 2008. p. 453–568. ISBN 978-0-12-373654-3. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123736543500110>>. Citado na página 43.

ASCENSAO L.; PAIS M.S. The Leaf Capitate Trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, Ultrastructure and Secretion. *Annals of Botany*, Academic Press, v. 81, n. 2, p. 9, 1998.

Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ap-bo/1998/00000081/00000002/art00550>>. Citado na página 86.

BAÑO, M. J. del et al. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, American Chemical Society, v. 51, n. 15, p. 4247–4253, jun. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf0300745>>. Citado na página 90.

BENSEBIA, O. et al. Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, n. 2, p. 161–166, jun. 2009. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844609000308>>. Citado 2 vezes nas páginas 56 e 72.

BENVENUTI, F.; GIRONI, F. High-Pressure Equilibrium Data in Systems Containing Supercritical Carbon Dioxide, Limonene, and Citral. *Journal of Chemical & Engineering Data*, American Chemical Society, v. 46, n. 4, p. 795–799, jul. 2001. ISSN 0021-9568. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/je000160q>>. Citado na página 57.

BERGER, T. A.; SMITH, R. M. *Packed Column SFC*. The Royal Society of Chemistry, 1995. X001–X004 p. (RSC Chromatography Monographs). ISBN 978-0-85404-500-6. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/9781847551603>>. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 60.

BIELSKI, R.; TENCER, M. Concept of Absolute Enantio-selective Separation. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 131, n. 4, p. 487–494, abr. 2010. ISSN 0022-1139. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022113909003716>>. Citado na página 74.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.-L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal*

of *Food Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 103–120, nov. 1996. ISSN 0168-1605. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816059601135X>>. Citado na página 161.

BOUSBIA, N. et al. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, v. 114, n. 1, p. 355–362, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4TN0M1B-4/2/e5d1d404e6f172ee5bcfcea3e580e357>>. Citado na página 155.

BRAGA, M. E. et al. Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, n. 1, p. 37–48, nov. 2008. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2008.05.005>>. Citado na página 43.

BRANDANI, V. et al. Phase equilibria of essential oil components and supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, v. 59, n. 2, p. 135–145, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG2-43MCK44-9V/2/d2a464acf60e18b9be5df92b388d076e>>. Citado na página 55.

BRUNNER, G. *Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*. Steinkopff, 1994. (Topics in physical chemistry). ISBN 9783798509443. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=Oc_vAAAAMAAJ>. Citado na página 138.

CANIOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 24, n. 17, p. 2647–2659, out. 2001. ISSN 1082-6076. Citado na página 190.

CARVALHO, J. R. N. et al. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global

yield, composition, and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 35, n. 3, p. 197–204, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VMF-4FR8PNY-1/2/55b171ee70d6813671ab7b2e226a0fc1>>. Citado 3 vezes nas páginas 72, 153 e 207.

CASTRO, M. D. Luque de; VALCÁRCEL, M.; TENA, M. T. *Analytical Supercritical Fluid Extraction*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. Citado na página 49.

CELIKTAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 553–559, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4HSY556-1/2/b9014e301d79fba21179a9078c888f0a>>. Citado 2 vezes nas páginas 84 e 155.

CHOI, J.-S. et al. Developmental Ultrastructure of Glandular Trichomes of *Rosmarinus officinalis*: Secretory Cavity and Secretory Vesicle Formation. *Journal of Plant Biology*, v. 54, n. 2, p. 135–142, mar. 2011. ISSN 1226-9239. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t15kg54258531872/>>. Citado 2 vezes nas páginas 86 e 88.

CHRASTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *The Journal of Physical Chemistry*, American Chemical Society, v. 86, n. 15, p. 3016–3021, jul. 1982. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/j100212a041>>. Citado na página 52.

CHRIST, B.; KESSELRING, K. *Process for isolating rosmarinic acid from plants*. [S.l.]: USPTO, 1982. Citado na página 91.

COLEMAN, W. M. et al. Isomeric enhancement of davanone from natural davana oil aided by supercritical carbon dioxide. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 8, p. 3037–43, abr. 2007. ISSN 0021-8561. Citado na página 82.

Corrêa Júnior, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. 2 ed.. ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1994. Citado 2 vezes nas páginas 81 e 85.

ACEF S.A. Wilson Roberto Cunha, Rodrigo Lucarini, Silvino, Maria José, Márcio Luis Andrade, Ademar Alves Silva, Andrea Carla Celotto e Carlos Henrique Gomes Martins. *Processo de obtenção de ácido rosmarínico (ar) e de derivados semi-sintéticos a partir da espécie vegetal origanum vulgare e formulações para o tratamento de diabetes contendo tais substâncias*. 2008. BR n. PI 0802688-2, 25 jun. 2008, 22 mar. 2011. Citado na página 91.

CUTILLO, F. et al. Terpenoids and phenol derivatives from Malva silvestris. *Phytochemistry*, v. 67, n. 5, p. 481–485, mar. 2006. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942205006631>>. Citado na página 216.

CUVELIER, M.-E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, n. 5, p. 645–652, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02518121>>. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 42.

DALTON, S. K.; BRANT, J. A.; WIESNER, M. R. Chemical interactions between dissolved organic matter and low-molecular weight organic compounds: Impacts on membrane separation. *Journal of Membrane Science*, v. 266, n. 1–2, p. 30–39, dez. 2005. ISSN 0376-7388. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738805003911>>. Citado na página 74.

DANIELSKI, L. et al. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, n. 2, p. 99–106,

fev. 2007. ISSN 02552701. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270106001218>>. Citado na página 55.

DAUKVSAS, E. et al. Effect of fast CO₂ pressure changes on the yield of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) and celery (*Apium graveolens* L.) extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 22, n. 3, p. 201–210, abr. 2002. ISSN 08968446. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00115-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00115-2)>. Citado na página 177.

De Oliveira, N. C. D. et al. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 50, n. 5, p. 1208–1214, jan. 2012. ISSN 1873-6351. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.028>>. Citado na página 189.

DELWICHE, J. The impact of perceptual interactions on perceived flavor. *Food Quality and Preference*, v. 15, n. 2, p. 137–146, mar. 2004. ISSN 09503293. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00041-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00041-7)>. Citado na página 168.

DI-GIACOMO, G. et al. Solubility of essential oil components in compressed supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, v. 52, p. 405–411, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG2-44MRSP1-1J/2/fca668e93025e41c291dbf8a8234277e>>. Citado 3 vezes nas páginas 42, 43 e 55.

ECKERT, C. a.; CHANDLER, K. Tuning fluid solvents for chemical reactions. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 13, n. 1-3, p. 187–195, jun. 1998. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844698000515>>. Citado na página 49.

ŻEGARSKA, Z. et al. Stabilization of butter with deodorized rosemary extract. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und*

-*Forschung A*, Springer Berlin / Heidelberg, v. 206, n. 2, p. 99–102, fev. 1998. ISSN 1431-4649. Citado na página 93.

EMBRAPA. *Transferência de Tecnologia Pantanal Semi-Árido: Alecrim*. Corumbá, MS: Embrapa, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 85 e 93.

EVANS, J.; SCARCELLI, S.; SWAIN, M. Temperature and energy performance of refrigerated retail display and commercial catering cabinets under test conditions. *International Journal of Refrigeration*, v. 30, n. 3, p. 398–408, maio 2007. ISSN 01407007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2006.10.006>>. Citado na página 107.

FANG, T. et al. Separation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 40, n. 1, p. 50–58, fev. 2007. ISSN 0896-8446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844606001410>>. Citado na página 74.

FISCHER, N. et al. Applications of high-speed counter-current chromatography for the separation and isolation of natural products. *Journal of Chromatography A*, v. 538, n. 1, p. 193–202, jan. 1991. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301916371>>. Citado na página 74.

FLECK, U.; TIEGS, C.; BRUNNER, G. Fractionation of fatty acid ethyl esters by supercritical CO₂: high separation efficiency using an automated countercurrent column. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 14, n. 1, p. 67–74, out. 1998. ISSN 08968446. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446\(98\)00100-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446(98)00100-4)>. Citado na página 187.

FOUST et al. *Princípios das Operações Unitárias*. Segunda ed. Rio de Janeiro: John Wiley & Sons, Ltd., 1982. 670 p. Citado na página 217.

FRANCIS, A. W. Ternary Systems of Liquid Carbon Dioxide. *The Journal of Physical Chemistry*, American Chemical Society, v. 58, n. 12, p. 1099–1114, dez. 1954. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/j150522a014>>. Citado na página 48.

FRANCISCO, J. d. C.; SIVIK, B. Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 23, n. 1, p. 11–19, maio 2002. ISSN 08968446. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00131-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00131-0)>. Citado na página 57.

FRUTOS, M.; HERNANDEZHERRERO, J. Effects of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the stability of bread with an oil, garlic and parsley dressing. *LWT - Food Science and Technology*, v. 38, n. 6, p. 651–655, set. 2005. ISSN 00236438. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643804002336>>. Citado na página 80.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, v. 102, n. 3, p. 898–904, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4KPFKVS-2/2/c92dbe2332ed8484d29e1e448cf5a824>>. Citado na página 159.

GARCÍA-RISCO, M. R. et al. Kinetic study of pilot-scale supercritical CO₂ extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, p. 0–5, set. 2010. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844610003207>>. Citado na página 72.

GASPAR, F. et al. Solubility of Echium, Borage, and Lunaria Seed Oils in Compressed CO₂. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 48, n. 1, p. 107–109, jan. 2003. ISSN

0021-9568. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/je020121+>>. Citado na página 55.

GENENA, A. K. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 463–469, 2008. Citado 4 vezes nas páginas 41, 42, 90 e 159.

GIDDINGS, J. C. et al. High Pressure Gas Chromatography of Nonvolatile Species. *Science*, v. 162, n. 3849, p. 67–73, 1968. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Citado na página 59.

GIDDINGS, J. C. et al. High pressure gas chromatography of nonvolatile species. Compressed gas is used to cause migration of intractable solutes. *Science (New York, N.Y.)*, v. 162, n. 849, p. 67–73, out. 1968. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5675186>>. Citado na página 51.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*, v. 26, n. 4, p. 401–407 %U <http://ci.nii.ac.jp/naid/10006958048/en>, 1993. Citado na página 56.

GUPTA, R. B.; SHIM, J. J. *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, 2007. 909 p. ISBN 9780849342400. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=CVHtiNmBmGgC>>. Citado 5 vezes nas páginas 56, 64, 65, 66 e 67.

HALLIWELL, B. Food-Derived Antioxidants. In: *Handbook of Antioxidants*. CRC Press, 2001. ISBN 978-0-8247-0547-3. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1201/9780203904046-pt1>>. Citado na página 90.

HAN, N. M. et al. Separation of Coenzyme Q10 in Palm Oil by Supercritical Fluid Chromatography. *American Journal of Applied Sciences*, v. 3, n. 7, p. 4, 2006. Citado na página 84.

HAWORTH, J. E. *Method for removing essential oils and antioxidants from extract products of lamiaceae species using rolled film evaporation*. [S.l.]: USPTO, 2002. Citado na página 91.

HOSSAIN, M. B. et al. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, American Chemical Society, v. 58, n. 19, p. 10576–81, out. 2010. ISSN 1520-5118. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf102042g>>. Citado na página 203.

HUANG, M. T. et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer research*, v. 54, n. 3, p. 701 – 8, 1994. ISSN 0008-5472. Citado na página 86.

IBÁÑEZ, E. et al. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, n. 2, p. 375–382, jan. 2003. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517098>>. Citado na página 159.

IBÁÑEZ, E. et al. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 4, p. 1400–1404, abr. 1999. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563988> <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980982f>>. Citado 5 vezes nas páginas 41, 42, 82, 159 e 176.

ICIS. *Ethanol Price Report - Chemical pricing information - ICIS Pricing*. 2008. Disponível em: <http://www.icispricing.com/il_shared/chemicals/SubPage496.asp>. Citado na página 138.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, jun. 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610016353>>. Citado 2 vezes nas páginas 74 e 81.

IVANOVIC, J. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 74, n. 7, p. 717–732, 2009. ISSN 0352-5139. Disponível em: <<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51390907717I>>. Citado 2 vezes nas páginas 72 e 89.

JAVANMARDI, J. et al. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 21, p. 5878–83, out. 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358453>>. Citado na página 127.

JO, S.-H.; NAM, H.-G.; MUN, S. Optimal design and experimental validation of a modified four-zone SMB process for the separation of a ternary amino acid mixture. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1288–1298, ago. 2010. ISSN 13595113. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.04.016>>. Citado na página 77.

JUPKE, A.; EPPING, A.; SCHMIDT-TRAUB, H. Optimal design of batch and simulated moving bed chromatographic separation processes. *Journal of Chromatography A*, v. 944, n. 1-2, p. 93–117, jan. 2002. ISSN 00219673. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01311-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01311-5)>. Citado 3 vezes nas páginas 78, 142 e 218.

KAEMMERER, H.; BRUNNER, G.; JOHANNSEN, M. Management and control of modifier content in preparative SFC solvent cycles. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 43,

n. 2, p. 204–213, dez. 2007. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2007.02.011>>. Citado na página 77.

KAISER, P. et al. Preparative-scale separation by simulated moving bed chromatography of biocatalytically produced regioisomeric lactones. *New biotechnology*, v. 25, n. 4, p. 220–5, abr. 2009. ISSN 1871-6784. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.01.005>>. Citado na página 77.

KASPEREIT, M. et al. Shortcut method for evaluation and design of a hybrid process for enantioseparations. *Journal of chromatography. A*, v. 1092, n. 1, p. 43–54, out. 2005. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.043>>. Citado 2 vezes nas páginas 142 e 218.

KENKEL, J. *Analytical chemistry for technicians, Volume 1*. [S.l.]: Lewis Publishers, 2003. 554 p. ISBN 1566705193. Citado 2 vezes nas páginas 118 e 130.

KLANCNIK et al. *In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations*. Des Moines, IA, ETATS-UNIS: International Association for Food Protection, 2009. 9 p. Citado 4 vezes nas páginas 41, 42, 84 e 90.

KLESPPER, E.; CORWIN, A. H. High pressure gas chromatography above critical temperatures. *The Journal of Organic Chemistry*, American Chemical Society, v. 27, n. 2, p. 700–706, fev. 1962. ISSN 0022-3263. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo01049a069> <http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/jo01049a069>>. Citado na página 159.

KLESPPER, E.; CORWIN, A. H.; TURNER, D. A. High pressure gas chromatography above critical temperatures. *The Journal of Organic Chemistry*, American Chemical

- Society, v. 27, n. 2, p. 700–701, 1962. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jo01049a069>. Citado na página 79.
- KOLB, B.; ETTRE, L. S. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*. New York: John Wiley & Sons, 1997. 320 p. ISBN 9780471192381. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=zTumsN0C41oC>. Citado 2 vezes nas páginas 110 e 171.
- KOTT, L.; FLETCHER, R. *Production of Rosmarinic Acid from Spearmint and uses Thereof*. [S.l.]: USPTO, 2010. Citado na página 92.
- LAWRENCE, B. M.; SHU, C. K. *Essential oils as components of mixtures: Analysis and differentiation*. In: *Flavor Measurement*. New York: Marcel Dekker Inc., 1993. Citado na página 90.
- LEAL, P. F. et al. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, American Chemical Society, v. 51, n. 9, p. 2520–2525, mar. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0260693>. Citado na página 159.
- LEE, J.; KIM, Y. S.; PARK, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochemical pharmacology*, v. 74, n. 7, p. 960–8, out. 2007. ISSN 0006-2952. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.007>. Citado na página 189.
- LIANG, J.; YEH, A.-I. Process conditions for separating fatty acid esters by supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 68, n. 9, p. 687–692, 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02662298>. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.
- LU, J. J.; WEI, Y.; YUAN, Q. P. Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by high-speed counter-current chromatography and followed by preparative liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*,

v. 55, n. 1, p. 40–43, maio 2007. ISSN 1383-5866. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586606003583>>. Citado na página 74.

LUO, S.-H. et al. Glandular trichomes of *Leucosceptum canum* harbor defensive sesterterpenoids. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v. 49, n. 26, p. 4471–5, jun. 2010. ISSN 1521-3773. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458721>>. Citado na página 86.

MARIN, M. et al. Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany*, v. 72, n. 3, p. 378–382, ago. 2006. ISSN 02546299. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2005.10.009>>. Citado na página 87.

MARSTON, A.; BOREL, C.; HOSTETTMANN, K. Separation of natural products by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 450, n. 1, p. 91–99, out. 1988. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300907180>>. Citado na página 74.

MARTEAU, P.; OBRIOT, J.; TUFEU, R. Experimental determination of vapor-liquid equilibria of CO₂ + limonene and CO₂ + citral mixtures. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 8, n. 1, p. 20–24, mar. 1995. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0896844695900462>>. Citado na página 55.

MARTINEZ, J. Fitting the Sovová's supercritical fluid extraction model by means of a global optimization tool. *Computers & Chemical Engineering*, v. 32, n. 8, p. 1735–1745, ago. 2008. ISSN 00981354. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098135407002268>>. Citado na página 50.

MARTINEZ., J. L. *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. [S.l.: s.n.], 2008. 402 p. Citado na página 48.

MARTINEZ, J. L.; ASHRAF-KHORASSANI, M.; CHORDIA, L. *Supercritical extraction process of grape seed oil and phenolic compounds*. San Francisco: [s.n.], 2003. Citado na página 70.

MATA, V. G.; RODRIGUES, A. E. Separation of ternary mixtures by pseudo-simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 939, n. 1-2, p. 23-40, dez. 2001. ISSN 00219673. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01335-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01335-8)>. Citado na página 77.

MATOS, H. A. et al. Phase equilibria of natural flavours and supercritical solvents. *Fluid Phase Equilibria*, v. 52, p. 357-364, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG2-44MRSP1-1C/2-/729e139b06af54bc86d2195065a8a4ed>>. Citado 3 vezes nas páginas 42, 43 e 55.

MAY, A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 2, p. 195-200, jun. 2010. ISSN 1516-0572. Citado 3 vezes nas páginas 85, 93 e 214.

MCHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. *Supercritical fluid extraction-Principles and practices*. 2nd. ed. [S.l.: s.n.], 1986. Citado 2 vezes nas páginas 53 e 61.

MEDINA, I.; MARTINEZ, J. L. Dealcoholation of cider by supercritical extraction with carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 68, n. 1, p. 14, 1997. Citado na página 70.

MUKHOPADHYAY, R. SFC: Embraced by industry but spurned by academia. *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 9, p. 3091-3094, maio 2008. ISSN 0003-2700. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0860119>>. Citado na página 81.

KALAMAZOO HOLDINGS INC. Roger Nahas, Elizabeth Barren e Gregory Reynhout. *Simple process to produce and separate water soluble and oil soluble antioxidative flavoring compositions from labiatae herbs using green solvents*. 2012. WO 2012-060861 A1, 25 out. 2011, 10 maio 2012. Citado na página 92.

NAVARRO, A. et al. Continuous chromatographic separation process: simulated moving bed allowing simultaneous withdrawal of three fractions. *Journal of Chromatography A*, v. 770, n. 1-2, p. 39–50, maio 1997. ISSN 00219673. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)01073-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(96)01073-4)>. Citado na página 77.

NOVASEP. Multicolumn Continuous Chromatography. 2011. Citado na página 218.

PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, Department of Microbiology, Regional Medical Research Centre, Bhubaneswar, Orissa, India, v. 89, n. 358, p. 39–46, 1997. Citado 5 vezes nas páginas 54, 62, 63, 84 e 89.

PEEV, G. et al. Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: Effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 89, n. 11, p. 2236–2243, nov. 2011. ISSN 02638762. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2011.04.014>>. Citado na página 193.

PENCHEV, P. *Study on the extraction and purification of bioactive products from plants by integration of separation techniques at low and high pressure (Fr.)*. Tese (Thesis) — University of Toulouse, 2010. Citado na página 193.

PENG, C.-H. et al. Supercritical Fluid Extracts of Rosemary Leaves Exhibit Potent Anti-Inflammation and Anti-Tumor Effects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 71, n. 9, p. 2223–2232, 2007. ISSN 0916-8451. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/70199?from=CrossRef>>. Citado 2 vezes nas páginas 72 e 93.

PEPER, S.; JOHANNSEN, M.; BRUNNER, G. Preparative chromatography with supercritical fluids. Comparison of simulated moving bed and batch processes. *Journal of chromatography. A*, v. 1176, n. 1-2, p. 246–53, dez. 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.090>>. Citado 4 vezes nas páginas 74, 78, 142 e 218.

PEREDA, J. A. O. *Tecnologia de alimentos*. Porto Alegre (RS): ARTMED, 2005. 294 p. ISBN 8536304367. Citado na página 41.

PEREDA, S.; BOTTINI, S.; BRIGNOLE, E. Fundamentals of Supercritical Fluid Technology. In: . CRC Press, 2009. null, n. null. ISBN 978-0-8493-7089-2. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1201/9781420006513.ch1>>. Citado na página 49.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, A.; ANGELA, M. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n. 3, p. 340–372, out. 2010. ISSN 1935-5130. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11947-009-0263-2>>. Citado na página 41.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 22, n. 5, p. 407–413, set. 2007. ISSN 08825734. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1813>>. Citado 5 vezes nas páginas 72, 134, 138, 212 e 213.

PERRUT, M. *Dispositif pour la mise en oeuvre de procedes d'extraction-separation-fractionnement par fluides supercritiques*. [S.l.]: FR 85 10468, 1985. Citado na página 115.

PETERS, M.; TIMMERHAUS, K.; WEST, R. *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. [S.l.]: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2002. 1008 p. ISBN 0072392665. Citado na página 136.

PETERSEN, M. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, v. 62, n. 2, p. 121–125, jan. 2003. ISSN 00319422. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)>. Citado na página 189.

PRADO, I. M. do. *Uso de simulador no estudo de aumento de escala e viabilidade econômica do processo de extração supercrítica de produtos naturais*. 140 p. Tese (Dissertação de mestrado) — UNICAMP, 2009. Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=727>. Citado 3 vezes nas páginas 136, 137 e 138.

PYNNONEN, B. Simulated moving bed processing: escape from the high-cost box. *Journal of Chromatography A*, v. 827, n. 2, p. 143–160, dez. 1998. ISSN 00219673. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00732-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00732-8)>. Citado 5 vezes nas páginas 26, 76, 139, 142 e 218.

RACINEX. *Racinex - Société*. 2010. Disponível em: <<http://www.racinex.net/>>. Citado na página 138.

RAMÍREZ, P. et al. Isolation of phenolic antioxidant compounds by SFC. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 35, n. 2, p. 128–132, set. 2005. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844605000276>>. Citado 4 vezes nas páginas 41, 42, 43 e 82.

RAMÍREZ, P. et al. Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 5, p. 1606–1613, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TGX-4K421DX-1/2/b0653e6e6cbb23fc46b83def6b4f091a>>. Citado na página 83.

RAMÍREZ, P. et al. Use of specially designed columns for antioxidants and antimicrobials enrichment by preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1143, p. 234–242, 2007. Citado 6 vezes nas páginas 41, 42, 43, 83, 84 e 89.

RAMÍREZ, P. et al. Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. *Journal of Chromatography A*, v. 1057, n. 1-2, p. 241–245, nov. 2004. ISSN 00219673. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304016310>>. Citado 3 vezes nas páginas 42, 43 e 82.

RATHORE, A. S.; VELAYUDHAN, A. *Scale-Up and Optimization in Preparative Chromatography: Principles and Biopharmaceutical Applications*. New York: Marcel Dekker Inc., 2003. ISBN 0-8247-0826-1. Citado 2 vezes nas páginas 142 e 143.

RAZBORŠEK, M. I. Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 55, n. 5, p. 1010–6, jul. 2011. ISSN 1873-264X. Citado na página 189.

REIS-VASCO, E. M. C.; COELHO, J. A. P.; PALAVRA, A. M. F. Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, John Wiley & Sons, Ltd., v. 14, n. 3, p. 156–160, 1999. Citado na página 80.

REVERCHON, E. Fractional separation of SCF extracts from marjoram leaves: mass transfer and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, Elsevier, v. 5, n. 4, p. 256–261, 1992.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089684469290016D>>. Citado 4 vezes nas páginas 42, 43, 56 e 117.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 10, n. 1, p. 1–37, abr. 1997. ISSN 08968446. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446\(97\)00014-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-8446(97)00014-4)>. Citado na página 176.

REVERCHON, E.; MARCO, I. D. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006. ISSN 0896-8446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VMF-4JTR966-7/2/07c5440bb7754ad380b910a03b197ed0>>. Citado na página 176.

REVERCHON, E.; SENATORE, F. Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 7, n. 4, p. 227–230, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2730070411>>. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.

RICHELMER, S. L. et al. Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. p. 45–58. Citado na página 86.

RICHTER, M.; SOVOVÁ, H. The solubility of two monoterpenes in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, v. 85, p. 285–300, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG2-44V485Y-8S/2/b2c763f8f27b7ba2b0980706514679ff>>. Citado na página 55.

Roberts{roJoint Chairman}, T. A. et al. (Ed.). *Micro-Organisms in Foods 6*. Boston, MA: Springer US, 2005. ISBN

978-0-306-48675-3. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/0-387-28801-5>>. Citado na página 162.

ROSA, P. T.; MEIRELES, M. A. A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, v. 67, n. 1-2, p. 235–240, mar. 2005. ISSN 02608774. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.064>>. Citado 3 vezes nas páginas 134, 137 e 138.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v. 91, n. 4, p. 621–632, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4DDXRSS-2/2-/bd4092a677684f8440adc13d52599579>>. Citado na página 84.

SANTOSFLORA. *Santosflora - Fornecedora de ervas medicinais aromáticas*. 2012. Disponível em: <<http://www.santosflora.com.br/>>. Citado na página 138.

SANTOYO, S. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 790–795, 2005. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2005/00000068/00000004/art00020>>. Citado 2 vezes nas páginas 84 e 89.

SARRADE, S.; GUIZARD, C.; RIOS, G. M. New applications of supercritical fluids and supercritical fluids processes in separation. *Separation and Purification Technology*, v. 32, n. 1-3, p. 57–63, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THJ-488P5SD-3/2-/00ef2791e356b423d2020821e164d923>>. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.

SARRADE, S. J.; RIOS, G. M.; CARLÈS, M. Supercritical CO₂ extraction coupled with nanofiltration separation:

Applications to natural products. *Separation and Purification Technology*, v. 14, n. 1–3, p. 19–25, ago. 1998. ISSN 1383-5866. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586698000562>>. Citado na página 74.

SARTÓRIO, M. L. et al. *Cultivo de plantas medicinais*. Viçosa, MG: [s.n.], 2000. Citado na página 85.

SETHI, S.; WIESNER, M. R. Cost Modeling and Estimation of Crossflow Membrane Filtration Processes. *Environmental Engineering Science*, v. 17, n. 2, p. 61–79, mar. 2000. ISSN 1092-8758. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ees.2000.17.61>>. Citado 2 vezes nas páginas 145 e 218.

SETIANTO, W. B. et al. Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 48, n. 3, p. 203–210, abr. 2009. ISSN 0896-8446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089684460800377X>>. Citado na página 74.

SHABTAY, A. et al. Synergistic antileukemic activity of carnosic acid-rich rosemary extract and the 19-nor Gemini vitamin D analogue in a mouse model of systemic acute myeloid leukemia. *Oncology*, v. 75, n. 3-4, p. 203–14, jan. 2008. ISSN 1423-0232. Citado na página 86.

SHARIATY-NIASSAR, M. et al. Economic evaluation of herb extraction using supercritical fluid. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, v. 15, n. 3, p. 143–148, 2009. ISSN 1451-9372. Disponível em: <<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93720903143S>>. Citado 3 vezes nas páginas 137, 212 e 213.

SIE, S. T.; RIJNDERS, G. W. A. High-Pressure Gas Chromatography and Chromatography with Supercritical

Fluids. II. Permeability and Efficiency of Packed Columns with High-Pressure Gases as Mobile Fluids under Conditions of Incipient Turbulence. *Separation Science*, v. 2, n. 6, p. 699–727, 1967. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/10.1080-/01496396708049734>>. Citado 5 vezes nas páginas 42, 43, 79, 80 e 90.

SIMÁNDI, B. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Research International*, v. 31, n. 10, p. 723–728, dez. 1998. ISSN 09639969. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996999000514>>. Citado 2 vezes nas páginas 176 e 180.

SLAMENOVÁ, D. et al. Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Letters*, v. 177, n. 2, p. 145–153, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T54-447DF64-4/2/fe7e3f2146d445066691237895b75099>>. Citado na página 41.

SOTO, M. L. et al. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 105, n. 1, p. 1–27, jul. 2011. ISSN 02608774. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02-.010>>. Citado na página 43.

SOVOVÁ, H. Solubility of natural products in SC CO₂ – Data condensed with Adachi – Lu equation. In: . [S.l.: s.n.], 2000. p. 915–920. Citado na página 55.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, n. 1, p. 35–52, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article-/B6VMF-4CS4SSN-1/2/a123d011fd573713ed8f05b13936ae5a>>. Citado na página 152.

STAHL, E.; QUIRIN, K. W. Dense gas extraction on a laboratory scale: A survey of some recent results. *Fluid Phase Equilibria*, v. 10, n. 2-3, p. 269–278, 1983. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG2-43RDB8T-75/2/10275395011f6fd5abda95da37cea871>>. Citado 3 vezes nas páginas 48, 53 e 54.

STAMENIC, M. et al. Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, n. 1, p. 125–133, fev. 2010. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2009.12.004>>. Citado na página 177.

STASSI, A.; SCHIRALDI, A. Solubility of vegetable cuticular waxes in supercritical CO₂ isothermal calorimetry investigations. *Thermochimica Acta*, v. 246, n. 2, p. 417–425, nov. 1994. ISSN 00406031. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)80106-1](http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031(94)80106-1)>. Citado na página 182.

TAYLOR, L. Supercritical fluid chromatography. *Analytical chemistry*, v. 82, n. 12, p. 4925–35, jun. 2010. ISSN 1520-6882. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405538>>. Citado na página 79.

TAYLOR, L. T. Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, n. 3, p. 566–573, jan. 2009. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844608003070>>. Citado 3 vezes nas páginas 42, 43 e 80.

TENA, M. T. et al. Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication. *Analytical Chemistry*, American Chemical Society, v. 69, n. 3, p. 521–526, fev. 1997. ISSN 0003-2700. Citado na página 127.

TOUMI, A. et al. Efficient optimization of simulated moving bed processes. *Chemical Engineering and Processing: Process*

Intensification, v. 46, n. 11, p. 1067–1084, nov. 2007. ISSN 02552701. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.026>>. Citado 2 vezes nas páginas 142 e 218.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v. 812, n. 1-2, p. 85–99, dez. 2004. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556490>>. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.

TURTON, R.; BAILIE, R. C.; WHITING, W. B. *Analysis, synthesis, and design of chemical processes*. Prentice Hall, 2009. (Prentice-Hall international series in the physical and chemical engineering sciences). ISBN 9780135129661. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=HiI9PwAACAAJ>>. Citado 2 vezes nas páginas 134 e 136.

TURTON, R. et al. *Analysis, synthesis, and design of chemical processes*. 4th. ed. Michigan: Prentice Hall, 2012. 1008 p. ISBN 0132618125. Citado na página 144.

VANNESTE, J. et al. Techno-economic evaluation of membrane cascades relative to simulated moving bed chromatography for the purification of mono- and oligosaccharides. *Separation and Purification Technology*, v. 80, n. 3, p. 600–609, ago. 2011. ISSN 1383-5866. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586611003546>>. Citado 2 vezes nas páginas 144 e 218.

VUUREN, S. F. van; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 22, n. 6, p. 540–544, nov. 2007. ISSN 08825734. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1843>>. Citado na página 89.

WANG, H. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, v. 87, n. 2, p.

307–311, set. 2004. ISSN 03088146. Citado 3 vezes nas páginas 127, 190 e 193.

WECKESSER, S. et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, v. 14, n. 7-8, p. 508–516, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B7GVW-4N0XNDD-5/2-/8c709ba0d8662d048a938b2b37ee5502>>. Citado na página 90.

XIANG, C.-L. et al. Trichome micromorphology of the East Asiatic genus *Chelonopsis* (Lamiaceae) and its systematic implications. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 205, n. 7, p. 434–441, jan. 2010. ISSN 03672530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2009.12.007>>. Citado na página 85.

YANAGIDA, A. et al. Comprehensive separation of secondary metabolites in natural products by high-speed counter-current chromatography using a three-phase solvent system. *Journal of Chromatography A*, v. 1151, n. 1–2, p. 74–81, jun. 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307005547>>. Citado na página 74.

YANG, W.-z. et al. A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 4. *Analytica Chimica Acta*, n. 0. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267012008847?v=s5>>. Citado na página 74.

ZIBETTI, A. W.; BOLZAN, A.; MARANGONI, A. Antimicrobial activity and composition of rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) extracts obtained with supercritical carbon dioxide pure and using ethanol as co-solvent. In:

(INPL), I. N. P. d. L. (Ed.). *9th International Symposium on SuperCritical Fluids*. Arcachon, France: ISASF, 2009. v. 9th, p. 319. Disponível em: <<http://www.isasf.net/fileadmin/files-/Docs/Arcachon/posters/p171-bolzan.pdf>>. Citado 4 vezes nas páginas 41, 42, 84 e 90.

STDUIENGESELLSCHAFT KOHLE. Kurt Zosel. *Process of recovering caffeine*. 1974. US 3,806,619, 3 maio 1972, 23 abril 1974. Citado 2 vezes nas páginas 69 e 70.

Apêndices

APÊNDICE A – Trabalhos publicados e enviados

A.1 Artigos completos enviados para periódicos

ZIBETTI, A. W., BOLZAN, A., BARTH, D.; AYDI, A.; ARAUCO, M. Recovery and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: economic evaluation. In: **Journal of Supercritical Fluids**.

ARAUCO, M.; ZIBETTI, A. W.; MARANGONI, A.; BOLZAN, A. Supercritical extraction of Muña (*Minthostachys mollis* [Kunth]) with addition of ethanol as co-solvent. In: **Journal of Supercritical Fluids**.

A.2 Trabalhos completos publicados em anais de congresso

ZIBETTI, A. W.; SILVEIRA, S. M.; BOLZAN, A. ; BATISTA, C. R. V. . Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de alecrim obtido por extração supercrítica. In: IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2009, Florianópolis. **IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos - Trabalhos Apresentados**. São Paulo : Revista Higiene Alimentar, 2009. v. 23. p. 326-327.

ZIBETTI, A. W., BOLZAN, A., MARANGONI, A. Anti-microbial activity and composition of rosemary (*Rosmarinus Of-*

ficinalis) extracts obtained with supercritical carbon dioxide pure and using ethanol as co-solvent. In: **9th International Symposium on Supercritical Fluids**, Arcachon, France. ISASF, 2009. p.319.